



Estudio de sistemas evolutivamente conservados de regulación coordinada de la expresión génica en bacterias

Mario Hüttener Queiroz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia

**ESTUDIO DE SISTEMAS EVOLUTIVAMENTE CONSERVADOS
DE REGULACIÓN COORDINADA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
EN BACTERIAS**

Mário Hüttener Queiroz
Tesis Doctoral
Barcelona, 2012

Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia

**ESTUDIO DE SISTEMAS EVOLUTIVAMENTE CONSERVADOS DE
REGULACIÓN COORDINADA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN
BACTERIAS**

Memoria presentada por Mário Hüttener Queiroz para optar al título de Doctor en
Biología por la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología, bienio 2006-2008

VºBº del director de Tesis,

Memoria presentada por,

Dr. Antonio Juárez

Mário Hüttener Queiroz

Anything found to be true of *E. coli* must also be true of elephants

Jacques Monod (1954)

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el “Programa Alβan – Programa de becas de alto nivel de la Unión Europea para America Latina (E06D101038BR)” a través de una beca predoctoral durante el periodo comprendido entre diciembre de 2006 y diciembre de 2009.

Cuando empecé a colaborar como estudiante en el actual Instituto Carlos Chagas (ICC – FIOCRUZ, Curitiba/Brasil) en 2001, me di cuenta de que la biología molecular aplicada a patógenos era mi gran pasión. En aquella época estaba trabajando con el virus dengue. En 2003 gracias a una beca concedida a mi por el Ministerio de Ciencia Brasileño, he podido profundizar mis conocimientos en biología molecular aplicada al estudio de virus realizando un Master en Biología Molecular por el ICC – FIOCRUZ en Curitiba. En 2005 cuando realicé la lectura del mismo, decidí que era hora de cambiar de área. La posibilidad de hacer un doctorado fuera de mi país siempre fué algo que he deseado. No por el hecho de que Brasil no fuera competente en el ámbito científico, sino todo lo contrario, Brasil cada vez se destaca más a nivel mundial en investigación básica y aplicada. El mayor deseo de poder realizar mi tesis doctoral en otro país ha venido por la ganas de poder experimentar otras culturas y otros conocimientos. En 2006 gracias al Programa Alβan, conseguí una beca para realizar mi tesis doctoral aquí en Barcelona en el grupo del Dr. Antonio Juárez. La decisión de cambiar de área y de país en conjunto me ha causado una gran expectativa. A lo largo de estos años, aquí en el grupo del Dr. Juárez, he podido poner en práctica lo que aprendí en Brasil y también he aprendido muchísimo trabajando con genética de procariotas. Hoy en día me siento muy realizado en haber ampliado mis conocimientos dentro de la microbiología.

Primeramente quisiera agradecer al Dr. Antonio Juárez que como mi director de tesis me ha ayudado muchísimo, no solamente en el ámbito técnico-científico de este trabajo, sino también en el ámbito personal. Muchas gracias por la paciencia a lo largo de estos años, por introducirme en el campo de la bacteriología, por financiar los últimos años de este trabajo y especialmente por acreditar y respetar el potencial de cada persona.

Quisiera agradecer al Dr. Carlos Balsalobre que me ha ayudado muchísimo en conseguir mi beca Alβan y también por haberme ayudado siempre que le pregunté: ¿tienes 1 minuto? Muchas gracias por las ayudas, por las charlas, por el buen rollo y por la paciencia.

A la Dra. Cristina Madrid quisiera agradecer por las infinitas preguntas que le he hecho, por haberme ayudado muchísimo con técnicas y protocolos. Muchas gracias por compartir la pasión por la buena música, claro que me refiero a Bossa Nova.

A la Dra. Sonia Paytubi, muchísimas gracias por toda ayuda sea de protocolos hasta experimentos. Gracias por el buen rollo, por la experiencia y confianza transmitidas.

A la Dra. Rosa Baños, muchísimas gracias por toda ayuda que me ha dado en mis primeros meses en el laboratorio y también por toda ayuda en los protocolos.

A Sonia Aznar, la Sonieta. Muchísimas gracias por las infinitas ayudas y charlas. Gracias por los momentos de descanso con el “piti”, por el buen rollo y especialmente por su óptimo gusto musical.

A mis compañeros de laboratorio primeramente a aquellos que ya han leído la tesis doctoral o están a punto. Quisiera agradecer al Nacho por toda ayuda en buscar una habitación aquí en Barcelona, muchas gracias por todo. A Aitziber muchas gracias por el buen rollo y por las charlas. A Jorge, Juanda y Laura que he podido convivir un poco más, muchas gracias por la compañía al largo de estos años en el laboratorio.

A los nuevos compañeros de laboratorio, quisiera agradecer al Llorenç (o Vicenç) gràcies per ajudar-me a practicar el català. A quien un día fue mi hija Carla, que hoy en día me siento orgulloso en saber que he podido contribuir con tu vida científica. Muchísimas gracias por haberme ayudado con “protocolos”. A Marta o Santa Marta, muchas gracias por todas las alzas que me has hecho con la máxima perfección y por las charlas en la poyata. A Tania o pelu, muchas gracias por compartir nuestras experiencias tropicales y por siempre tener una sonrisa. A los integrantes del ¼ del laboratorio 3, quisiera agradecer al Fran que por más que sea “incomprendido” por la mayoría de la gente, es un tío estupendo y además tiene vocación para DJ. Gracias por las charlas por las músicas en la radio *Salmonella* y por aparentar ser de 1979 como yo (jejeje). A la Mari, muchas gracias por la compañía a las primeras horas de los duros días de trabajo y por las charlas. A Lucía que trae con ella “El Uruguay Natural”, muchas gracias por las charlas y por recordarme que lindo es Uruguay.

A los compañeros del departamento de microbiología, quisiera agradecer a mis compañeros de las clases del doctorado. Al Jesús con todo su buen rollo, muchas gracias por todas las charlas y por compartir las prácticas de virología conmigo. Al Arnau, que por más que nunca me haya hablado en català - por más català que sea -

muchas gracias por la compañía todos estos años y por ser tan macu como eres. A Sara lee, muchas gracias por las charlas al largo de estos años, te echaré de menos. A Daniela, que pelo pouco tempo que convivemos juntos deu para perceber a boa pessoa que você é. Muito obrigado pelas conversas e pela sua simpatia, beijinhos!!

Quisiera también agradecer a Patxi que siempre ha estado dispuesto a ayudar y a resolver cualquier problema. Muchas gracias por todo.

A los demás compañeros del departamento de microbiología, quisiera agradecer por los momentos compartidos juntos. Muchas gracias.

A los secretarios del departamento. Quisiera agradecer a Bea, que me ha ayudado muchísimo con todo los papeles de la beca, muchísimas gracias. A Macu, quisiera agradecer por las infinitas ayudas y consejos. Muchas gracias por la paciencia, y por la sonrisa siempre presente. A Manolo, muchas gracias por la ayuda con los temas burocráticos de esta tesis y con el papeleo de la lectura. A Susana, muchas gracias por la paciencia y por las charlas.

A los integrantes del grupo pero del IBEC, quisiera agradecer a Mar (o MarT) moltes gràcies per tot. Gràcies per ajudar-me a practicar al català i per tenir sempre un somriure!!! Al Dr. Eduard Torrents, muchas gracias por la ayuda y por siempre estar dispuesto a ayudar. A Manu, thanks a lot for everything!! A Francesca (o Paqui o Pepis) muchas gracias por la compañía. A Mari, muchas gracias por siempre estar dispuesta a ayudar, por las charlas y por el buen rollo.

A minha família, quero agradecer pela confiança em todos os momentos que me levaram a poder defender esta tesis de doutorado. Em especial que agradecer com todo o meu respeito e admiração ao meu pai que sempre acreditou que agente tem que fazer o que agente gosta, obrigado pai por sempre ter insistido que estudar é a melhor opção. Quero agradecer ao meu pai a minha mãe e a minha irmã (Nane) que aceitaram a minha decisão de passar uma temporada fora do Brasil e sempre respeitaram as minhas vontades. Obrigado por sempre estarem aqui comigo por mais que o oceano atlântico nos separe. Sempre levo vocês comigo seja aonde for. Em especial quero agradecer ao meu Toni que é o meu grande suporte aqui em Barcelona. Obrigado pela valiosa

convivência, pelos conselhos, pela paciência e pelo amor. Você sabe que se não fosse por você eu já não estaria aqui. Obrigado por permitir que hoje eu tenha uma segunda família e assim não sinta tantas saudades da minha.

Aos meus amigos que já fazem parte da minha família, em especial a Gil, Tsai, Patricia, Alejandro, Mariana, Renata, que por mais que passe o tempo e que cada vez mais nos separemos levo vocês comigo todos os dias. Obrigado por todos os momentos que vivemos juntos, pelas boas risadas e pela valiosa amizade.

Por último quero agradecer ao Programa Alβan pelo financiamento desta tesis de doutorado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS	3
1.2 REGULACIÓN DE LA VIRULENCIA COMO UN EJEMPLO DE REGULACIÓN AMBIENTAL.....	3
1.2.1. Temperatura.....	4
1.2.2. Osmolaridad.....	7
1.2.3. Hierro.....	7
1.2.4. pH.....	8
1.2.5. Oxígeno.....	9
1.3 PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE.....	10
1.4 LA PROTEÍNA H-NS.....	14
1.4.1. Dominios estructurales de la proteína H-NS.....	17
1.4.2. Modulación de la expresión génica por la proteína H-NS.....	20
1.4.3. La proteína H-NS como un silenciador del ADN xenogénico.....	23
1.4.3.1. Antagonismo en la represión de H-NS sobre ADN xenogénico.....	25
1.5 LA FAMILIA DE PROTEÍNAS Hha/YmoA.....	27
1.6 <i>Salmonella enterica</i>	29
1.7 ISLAS DE PATOGENICIDAD (IPA).....	30
1.7.1. Islas de patogenicidad en <i>Salmonella</i>	32
1.7.2. Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> I (SPI1).....	34
1.7.2.1. Regulación de la SPI1 – el regulador transcripcional Hla.....	35
1.7.2.2. Otros reguladores de la SPI1.....	38
1.7.3. Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 2 (SPI2).....	40
1.7.3.1. Regulación de la SPI2.....	42
1.8 <i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVO (EAEC).....	43
1.8.1. Factores de virulencia encontrados en EAEC.....	45
1.8.1.1. Toxinas.....	46
1.8.1.2. Fimbrias y adhesinas.....	47
1.8.1.3. Sistemas de secreción del tipo I y II encontrados en <i>E. coli</i> 042.....	49

1.8.1.4. Sistemas de secreción del tipo III encontrados en <i>E. coli</i> 042.....	50
1.8.2. Proteínas ortólogas a HilA de <i>Salmonella</i> encontrados en <i>E. coli</i> 042.....	53
2. OBJETIVOS.....	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS.....	61
3.1.1. Cepas bacterianas.....	61
3.1.2. Plásmidos.....	63
3.1.3. Bacteriófagos.....	65
3.2. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	65
3.3 MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS.....	65
3.3.1. Medios de cultivo.....	65
3.3.2. Antibióticos.....	67
3.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	67
3.4.1. Esterilización.....	67
3.4.2. Mantenimiento de microorganismos.....	68
3.4.3. Inoculación y cultivo de microorganismos.....	68
3.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ADN.....	68
3.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico.....	68
3.5.2. Utilización de enzimas de restricción y ligación.....	69
3.5.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	69
3.5.4. Secuenciación de fragmentos de ADN.....	70
3.5.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	70
3.5.6. Aislamientos de fragmentos de ADN.....	71
3.5.7. Marcaje radioactivo de oligonucleótidos y PCR con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$..	71
3.5.8. Ensayos de EMSA.....	72
3.6 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN.....	73
3.6.1. Extracción de ARN total.....	73
3.6.2. Cuantificación del ARN total purificado.....	73
3.6.3. RT-PCR.....	73
3.6.4. Estudios de transcripción <i>in vitro</i>	74

3.6.4.1. Ensayos de <i>Primer Extension</i>	75
3.6.5. Secuenciación masiva de ARN.....	76
3.6.5.1. Análisis estadístico.....	77
3.7 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA.....	77
3.7.1. Transformación bacteriana.....	
3.7.1.1. Transformación bacteriana de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂ y transformación.....	77
3.7.2. Electroporación.....	78
3.7.3. Transducción generalizada con bacteriófagos utilizados en <i>E. coli</i> ..	
3.7.3.1 Bacteriófago P1 <i>vir</i>	78
3.7.3.2. Obtención de lisados de P1 <i>vir</i>	79
3.7.3.3. Titulación de lisados de P1 <i>vir</i>	79
3.7.3.4. Transducción con P1 <i>vir</i>	79
3.7.3.5. Inserción de fusiones transcripcionales en el <i>loci attB</i> del cromosoma de <i>E. coli</i>	80
3.7.3.5.1. Construcción de la fusión transcripcional en el plásmido pRS551.....	80
3.7.3.5.2. Transferencia de las fusiones transcripcionales del plásmido pRS551 al bacteriófago λRS45.....	81
3.7.3.5.3. Obtención de lisógenos que contengan una fusión transcripcional en <i>loci attB</i> del cromosoma.....	81
3.7.4. Transducción generalizada con bacteriófagos utilizados en <i>S.</i> <i>enterica</i> serovar Typhimurium (bacteriófago P22).....	82
3.7.4.1. Obtención de lisados de P22.....	82
3.7.4.2. Titulación del lisado fágico.....	82
3.7.4.3. Transducción con P22.....	83
3.7.5. Conjugación.....	84
3.8 MÉTODOS DE MUTAGÉNESIS BACTERIANA.....	85
3.8.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR.....	85
3.8.2. Generación del fragmento de PCR conteniendo un gen de resistencia a antibióticos.....	85
3.8.3. Reemplazamiento alélico.....	86
3.8.4. Eliminación del casete de resistencia al antibiótico.....	86

3.8.5. Construcción de fusiones génicas con el gen <i>lacZ</i> mediante la recombinasa FLP.....	87
3.8.6. Construcción de fusiones génicas con la secuencia codificante para 3XFLAG mediante la recombinasa FLP.....	87
3.9 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS.....	88
3.9.1. Precipitación de proteínas secretadas.....	88
3.9.2. Obtención de extractos totales.....	89
3.9.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS...89	
3.9.3.1. Marcadores de peso molecular.....	91
3.9.3.2. Tinción de geles de proteínas con Azul de Coomassie...91	
3.9.4. Inmunodetección de proteínas.....	91
3.9.4.1. Transferencia de proteínas a membranas por sistema semi-seco.....	92
3.9.4.2. Inmunodetección y revelado quimioluminiscente por el sistema ECL™.....	92
3.9.5. Valoración de actividades enzimáticas.....	93
3.9.5.1. Determinación de la actividad β-galactosidasa.....	93
3.10 ESTUDIOS DE AGREGACIÓN CELULAR.....	94
3.11 ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE BIOFILMS.....	94
4. RESULTADOS.....	97
4.1 REGULACIÓN AMBIENTAL DEL REGULADOR DE LA ISLA DE PATOGENICIDAD I DE <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SV5015, EL GEN <i>hilA</i>	99
4.1.1. Cosntrucción de una fusión transcripcional <i>hilA::lacZ</i> plasmídica...	
4.1.2. Estudios de la regulación de <i>hilA</i> utilizando los plásmidos pHILA505 y pHILA877 en <i>E. coli</i> AAG1.....	100
4.1.3. Regulación de la expresión del gen <i>hilA</i> mediante la fusión <i>hilA::lacZ</i> clonada en el plásmido pHILA877 en la cepa SV5015 de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.....	102
4.1.4. Uso de una fusión cromosómica <i>hilA::lacZ</i> en la cepa SV5015 de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium para estudiar la regulación del gen <i>hilA</i>	103

4.1.4.1. Regulación ambiental de la fusión <i>hilA::lacZ</i> en la cepa SV5015.....	103
4.1.4.2. Regulación por temperatura y osmolaridad del gen <i>hilA</i> por las proteínas asociadas al nucleoide H-NS y Hha.....	105
4.1.4.3. La inducción de <i>hilA</i> en fase estacionaria requiere la proteína IHF.....	109
4.1.4.4. Las proteínas H-NS y IHF son capaces de unirse a región promotora de <i>hilA</i>	114
4.1.4.5. IHF es capaz de antagonizar el efecto represor de H-NS en la transcripción de <i>hilA</i>	115
4.2 PROTEÍNAS TIPO HIL A ENCONTRADAS EN <i>E. coli</i> EAEC.....	117
4.2.1. El regulador de la isla ETT2, la proteína YgeH, comparte homología significativa de secuencia con las proteínas EilA y HilA.....	117
4.2.2. Complementación en <i>trans</i> del fenotipo HilA ⁻ en la cepa SV5015 por las proteínas EilA e YgeH.....	120
4.2.3. Las proteínas EilA e YgeH activan la expresión de SipA vía InvF en <i>S. Typhimurium</i>	122
4.2.4. Regulación de la expresión de los moduladores EilA e YgeH...	124
4.2.5. Regulación cruzada de EilA e YgeH entre los regulones encontrados en las islas de patogenicidad ETT2 y <i>eip</i> en EAEC 042...	130
4.3 PAPEL DE LA MUTACIÓN Δhha EN <i>E. coli</i> EAEC 042.....	132
4.3.1. La pérdida de la proteína Hha reduce la formación de biofilm y aumenta la agregación celular en <i>E. coli</i> 042 a 37°C.....	132
4.3.2. El fenotipo de agregación celular del mutante de 042 Δhha puede ser complementado en <i>trans</i> con el plásmido pBADHha.....	134
4.3.3. Efecto de la mutación Δhha en la expresión de los genes <i>aggR</i> , <i>aafA</i> y <i>aap</i> de <i>E. coli</i> 042.....	136
4.3.4. La pérdida del activador transcripcional AggR en un fondo genético <i>hha</i> ⁻ restaura el fenotipo salvaje de agregación celular.....	138
4.3.5. La pérdida de la proteína Hha desencadena una sobreexpresión del activador transcripcional AggR en <i>E. coli</i> EAEC 042.....	140

4.3.6. Análisis transcriptómico de la cepa 042 y su respectivo mutante <i>hha</i>	141
5. DISCUSIÓN	147
5.1. Regulación del gen <i>hilA</i> por las proteínas asociadas al nucleoide H-NS y Hha.....	149
5.2 Las proteínas EilA e YgeH, dos homólogas de HilA en la cepa de EAEC 042 de <i>E. coli</i>	152
5.3 Un fenotipo inesperado: la mutación <i>hha</i> modifica la agregación celular y la formación de biofilm en la cepa 042.....	154
6. CONCLUSIONES	157
7. BIBLIOGRAFIA	161
ANEXO I	185
ANEXO II	193

1. INTRODUCCIÓN

1.1. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS

Una de las características de las células bacterianas es la capacidad de adaptarse rápidamente a los frecuentes cambios en las condiciones ambientales del entorno donde se encuentran. En los procariotas la regulación de la expresión génica constituye una herramienta fundamental para dicha adaptación a las condiciones ambientales, posibilitando que tales cambios se vean reflejados en los patrones de expresión génica. De este modo, las bacterias son capaces de detectar variaciones en los parámetros físicoquímicos del medio externo, ajustando así la maquinaria bioquímica en función de estos cambios. Dichas variaciones pueden ser tanto en parámetros químicos, relacionados con aspectos nutricionales del medio (presencia o ausencia de iones, fuentes de energía, receptores finales de electrones), como de parámetros físicos (temperatura, presión hidrostática y presión osmótica). Los estímulos ambientales son captados directamente o indirectamente por la célula a través de los correspondientes sensores. Puede ser que el estímulo sea capaz de penetrar al interior de la célula (por ejemplo, un substrato del metabolismo) o bien que se produzca la detección del estímulo en respuesta a un efecto sobre componentes celulares (por ejemplo, cambios de temperatura que pueden llegar a producir un efecto en el plegamiento de determinadas proteínas). Existen estímulos, como el pH y la osmolaridad, que son detectados a través de receptores específicos de membrana que actúan como sensores de señal en la superficie celular (Gross & Neidhardt, 1996). Los mecanismos de reconocimiento de estímulos exteriores, la transmisión de estas informaciones (y si la respuesta que comporta es específica o global) pueden ser de más o menos complejidad dependiendo del sistema particular.

1.2. REGULACIÓN DE LA VIRULENCIA COMO UN EJEMPLO DE REGULACIÓN AMBIENTAL

La capacidad de modificar el patrón de expresión génica en función de parámetros ambientales es un aspecto crucial en la supervivencia tanto de bacterias que se encuentran en el medio ambiente externo como de bacterias patógenas localizadas en el interior de un organismo hospedador. En este último caso, para que las bacterias

puedan colonizar con éxito determinados tejidos y desencadenar la consecuente infección, es necesario llevar a cabo una regulación coordinada, simultánea y/o secuencial de la expresión los distintos factores de virulencia bacteriana implicados en dicho proceso. La expresión adecuada de los distintos factores de virulencia tiene su origen en el hecho que las bacterias son capaces de obtener suficiente información acerca del nicho ecológico en que se encuentran en cada momento, detectando parámetros ambientales específicos del interior del hospedador. Las bacterias patógenas han desarrollado un complejo sistema de detección de señales que les permite inducir la expresión de determinados genes cuyos productos son necesarios para llevar a cabo el proceso de colonización e infección del hospedador. Dentro de este conjunto de genes se destacan los que codifican para factores de virulencia, tales como toxinas, factores de adhesión, invasinas o cápsulas. Normalmente estos factores de virulencia son elementos no esenciales para la fisiología celular durante la fase de vida libre del patógeno, siendo únicamente necesarios durante el proceso de infección. Por este motivo, su expresión se encuentra regulada de forma muy precisa y rara vez se presenta de forma constitutiva debido al elevado gasto energético que ello supondría (Guiney, 1997). A lo largo de las diversas fases de un proceso infeccioso son necesarios distintos factores de virulencia, por lo que la bacteria seguirá detectando estímulos del medio y regulando la expresión de los correspondientes genes a lo largo de todo el proceso. De esta forma, la bacteria está continuamente obteniendo información de su entorno y ajusta la expresión de sus genes de virulencia en función de la información recibida. Entre los parámetros ambientales que afectan a la expresión de los factores de virulencia cabe resaltar la temperatura, la osmolaridad, la disponibilidad de hierro, el pH y los niveles de oxígeno.

1.2.1. Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que desencadena un importante efecto sobre los procesos celulares, por lo que las bacterias presentan diversos termosensores moleculares que les permiten ajustar su patrón de expresión proteica ante cambios en este parámetro. Existen tres posibles factores que intervienen en los diferentes mecanismos de termorregulación de la expresión génica: I) la topología del ADN, que viene determinada por el superenrollamiento del ADN y su curvatura (Hurme & Rhen, 1998), II) la estructura del ARN mensajero y III) el plegamiento proteico.

I) El supererollamiento del ADN, proceso por el cual el ADN cromosómico o plasmídico es tensionado de forma helicoidal, requiere la participación equilibrada de dos enzimas, la topoisomerasa I y la ADN girasa (o topoisomerasa II). En bacterias, cambios en el balance entre ATP/ADP celular, osmolaridad del medio, temperatura y anaerobiosis son procesos que afectan el supererollamiento del ADN y consecuentemente la expresión génica (Hurme & Rhen, 1998; Snyder & Champness, 2007). La actividad de determinados promotores de genes bacterianos responde a cambios en la temperatura que a su vez, están relacionados con el nivel de supererollamiento del ADN. El supererollamiento del ADN también parece jugar un papel central en la regulación dependiente de temperatura de genes asociados a factores de virulencia (Dorman, 1991). Como ejemplo, en *S. Typhimurium* varios genes asociados al proceso de invasión celular poseen una regulación dependiente del supererollamiento del ADN (Galán & Curtiss, 1990). En *Shigella flexneri* la transcripción de genes asociados a virulencia codificados por el plásmido de virulencia de esta cepa son regulados por temperatura a través del supererollamiento del ADN (Dorman *et al.*, 1990).

II) En relación a la estructura del ARN mensajero (ARNm), se han descrito diferentes efectos sobre la traducción que son dependientes de temperatura. Normalmente los efectos al nivel de ARNm se producen por la oclusión o cambios en la secuencia Shine-Dalgarno. Un posible mecanismo mediante el cual la temperatura regula la maquinaria traduccional incluye cambios en la estructura del ARNm o las proteínas ribosómicas, o simplemente, un cambio en la cinética de traducción provocado por la temperatura (Hurme & Rhen, 1998). También es importante la formación de “*R-loops*” en el proceso de elongación de la transcripción. La formación de dichos bucles se produce por hibridación de la molécula de ARN que está siendo sintetizada con el dúplex de ADN, formándose un bucle constituido por un dúplex ADN-ARN y una cadena sencilla de ADN de idéntica secuencia al ARN hibridado. La formación de esta estructura, que viene determinada por la topología del ADN y su secuencia nucleotídica, bloquearía la elongación de la cadena de ARN mensajero (Baaklini *et al.*, 2004; Drolet, 2006; Huertas & Aguilera, 2003). Otro mecanismo recientemente caracterizado sería la oclusión de la secuencia Shine-Dalgarno por un elemento molecular conocido como termómetros de ARN (ARNTs). Estas estructuras se encuentran en la secuencia no codificante (5' UTR) de algunos genes involucrados en virulencia y choque térmico (Narberhaus, 2010; Narberhaus *et al.*, 2006). Los ARNTs

responden a cambios de temperatura de forma que ellos son capaces de controlar la traducción de ARNm pre-existentes o en vía de síntesis (Kortmann & Narberhaus, 2012). El proceso molecular es dependiente de un cambio de temperatura y consiste en la oclusión de la secuencia de Shine-Dalgarno debido a formación de estructuras secundarias, (Fig. 1.1), (Kortmann & Narberhaus, 2012; Narberhaus *et al.*, 2006).

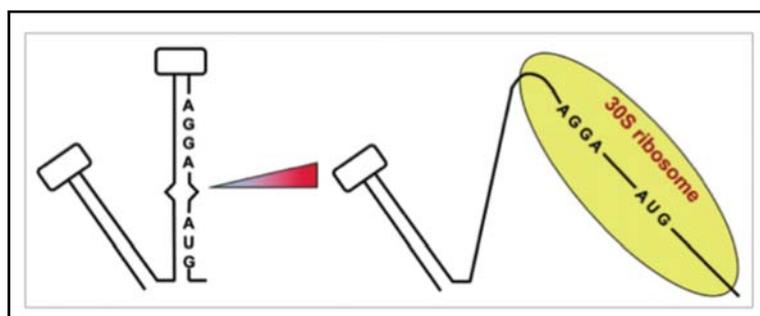


Figura 1.1. Modelo de acción de ARNTs. A baja temperatura (lado izquierdo), el acceso a la secuencia Shine-Dalgarno (AGGA) y en algunos casos el codón de inicio AUG está bloqueado al formarse una estructura secundaria. A alta temperatura (lado derecho), se deshace la estructura secundaria y el ribosoma tiene acceso. Adaptado de (Narberhaus, 2010).

III) La proteína TlpA (*alpha-helical coiled-coil protein*) es un ejemplo del efecto de la temperatura sobre el plegamiento proteico. Fue el primer caso descrito de una proteína capaz de regular la expresión génica a través de distintas formas de plegamiento de su estructura terciaria dependientes de cambios de temperatura (Hurme *et al.*, 1997). TlpA es un regulador transcripcional codificado por el plásmido de virulencia de *Salmonella*. Se ha determinado que esta proteína es capaz de regular su propia expresión, siendo la misma dependiente del equilibrio entre distintas formas de plegamiento proteico, variables por cambios de temperaturas y, que a su vez determinan su actividad de unión al ADN (Hurme & Rhen, 1998). El mecanismo molecular está basado en los dominios “*coiled-coil*” (bucles superenrollados) que posee esta proteína. Tales dominios son estructuras versátiles presentes en un gran número de proteínas y responsables de mantener un equilibrio entre los monómeros libres y los oligómeros agrupados (Hurme & Rhen, 1998). Este equilibrio depende tanto de la temperatura como de la concentración de la proteína y puede ser utilizado como sensor de la temperatura incluso cuando la proteína no es un regulador de la expresión génica (Hurme & Rhen, 1998). Otro ejemplo que ilustra la regulación dependiente de

temperatura es la capacidad de oligomerización de la proteína H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring protein*), la cual es dependiente de temperatura (Stella *et al.*, 2006).

1.2.2. Osmolaridad

La osmolaridad es otro de los factores ambientales que afectan a la regulación de la expresión de factores de virulencia en diversos microorganismos patógenos. En la regulación de la expresión génica ante cambios en la osmolaridad está implicado el grado de superenrollamiento del ADN. Un cambio brusco en la osmolaridad también del medio, es decir, un choque osmótico puede aumentar en cuatro veces la relación ATP/ADP celular, aumentando al mismo tiempo el grado de superenrollamiento global del cromosoma bacteriano (Higgins *et al.*, 1988).

La osmolaridad, mediante la regulación de la expresión génica, influencia la expresión de genes asociados a la maquinaria celular como, por ejemplo, el gen *proU* (codifica un transportador de glicina betaina), la transcripción del cual se incrementa en respuesta a un aumento en la osmolaridad del medio (Higgins *et al.*, 1988). Por lo que respecta a genes asociados a la virulencia, existen varios estudios donde se ha descrito a la osmorregulación como uno de los factores decisivos para la correcta expresión de los mismos. Por ejemplo en *E. coli* la expresión del operón *sfa* que codifica la adhesina fimbrial S (Morschhäuser *et al.*, 1993), la producción de fimbrias tipo I de adherencia agregativa en *E. coli* enteroagregativas (EAEC) (Nataro *et al.*, 1994) y la expresión de la α -hemolisina (Mouriño *et al.*, 1994) son sensibles a la osmolaridad. En *Salmonella*, el regulador transcripcional *yfeR* (Baños *et al.*, 2011) y el sistema de secreción del tipo III, codificado en la isla de patogenicidad I, se inducen en condiciones de elevada osmolaridad (Bajaj *et al.*, 1996), mientras que el sistema de secreción del tipo III presente en la isla de patogenicidad II se induce en condiciones de baja osmolaridad (Garmendia *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000).

1.2.3. Hierro

El hierro es un elemento fundamental para el crecimiento de prácticamente todas las formas de vida. Aún siendo un elemento muy abundante en la corteza terrestre, su captación por parte de los seres vivos resulta muchas veces un proceso difícil, dado que

en condiciones de aerobiosis y a pH neutro se encuentra en la forma de ión férrico (Fe^{3+}), que resulta insoluble. Por otro lado, en condiciones de anaerobiosis, la forma ferrosa (Fe^{2+}), resulta soluble y por tanto más fácil de captar pero provoca la formación de radicales hidroxilo (OH^\cdot) que resultan tóxicos. Este problema, sin embargo, no existe si el ión ferroso se encuentra unido a proteínas transportadoras, como ocurre en el interior de hospedadores animales, en los que se encuentra asociado a proteínas como, por ejemplo, la transferrina, lactoferrina o la misma hemoglobina. Las bacterias presentan diversos mecanismos para obtener hierro, como son la captación de grupos hemo (Genco & Dixon, 2001) o la secreción de sideróforos y/o hemóforos que forman complejos con la fuente de hierro, uniéndose posteriormente a la superficie bacteriana mediante receptores específicos. La capacidad de las bacterias patógenas de captar hierro en el organismo hospedador contribuye de forma importante a su capacidad de virulencia, ya que facilita su crecimiento en el interior del organismo (Wooldridge & Williams, 1993). La presencia de hierro provoca la expresión de varios factores de virulencia como cápsulas (Telang *et al.*, 2001), adhesinas (Moreira *et al.*, 2003), y toxinas como la “*shiga-toxin*” (Litwin & Calderwood, 1993).

Un mecanismo mediante el cual el hierro regula la expresión génica en bacterias gram-negativas y algunas gram-positivas viene mediado por la proteína Fur (*Ferric uptake regulator*). Originalmente descrita en *E. coli*, Fur es una proteína represora sensible a presencia de hierro, estando primeramente involucrada en el control de la expresión de genes responsables del transporte de hierro y formación de sideróforos (Lee & Helmann, 2007). En presencia de iones Fe^{2+} , Fur forma un complejo con este ión y reprime la transcripción mediante unión a secuencias específicas en la región promotora (cajas Fur) de genes implicados en la captación del hierro, toxinas como la hemolisina, genes implicados en la síntesis de pili (Agranoff & Krishna, 2004), y activa la expresión de la maquinaria de secreción del tipo III de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (Ellermeier & Slauch, 2008; Teixidó *et al.*, 2011).

1.2.4. pH

Antes de alcanzar el intestino y colonizarlo, las bacterias patógenas han de atravesar el estómago, donde las condiciones de pH llegan a ser extremadamente ácidas. Bacterias entéricas tales como *E. coli* y *Salmonella* spp. sobreviven al tránsito estomacal pero no crecen en tal nicho (Audia & Foster, 2003; Foster, 2004). Es por este

motivo que estas bacterias, en respuestas a cambios en el pH del medio, han desarrollado la capacidad de ajustar la actividad y síntesis de proteínas asociadas no sólo a procesos que le permitan su supervivencia en estas condiciones extremas, como por ejemplo el sistema *gad* de resistencia al ácido en *E. coli* (Castanie-Cornet *et al.*, 1999), sino también a procesos relacionados con su capacidad de virulencia. Para estas bacterias la acidificación del medio es una señal que les indica la presencia de un organismo hospedador, por lo que responden con la expresión de un conjunto de genes entre los que se encuentran genes relacionados con la virulencia.

S. Typhimurium es considerado un organismo neutrófilo, es decir, capaz de crecer en un ambiente con un pH entre 6 y 8 (Riesenberg-Wilmes *et al.*, 1996). Durante el proceso de colonización de un hospedador, *Salmonella* es expuesta a un drástico cambio de pH al encontrar el ambiente ácido del estomago y también al llegar a invadir macrófagos, donde se concentran en fagolisosomas. Una posible explicación de cómo *Salmonella* es capaz de sobrevivir en condiciones extremas de pH ácido, sería la capacidad de una respuesta adaptativa al ácido (ATR – *adaptive acid tolerance response*) (Foster & Hall, 1990). Esta respuesta desencadena una reprogramación génica de la célula bacteriana activando la expresión de genes capaces de proteger la célula frente una variación de pH (Foster & Hall, 1990; Riesenberg-Wilmes *et al.*, 1996). Un caso extremo lo podemos encontrar en *Helicobacter pylori*, capaz de colonizar la mucosa gástrica y en la que se ha comprobado que la proteína Fur es un componente clave para la adaptación a pH ácido (Bijlsma *et al.*, 2002).

1.2.5. Oxígeno

La reducida tensión de oxígeno en el hospedador, así como los elevados niveles de CO₂, son importantes señales para las bacterias patógenas, modificando la expresión de genes esenciales para su capacidad de colonización (Ernst *et al.*, 1990; Shimamura *et al.*, 1985; Troxell *et al.*, 2011a).

En diversos patógenos bacterianos la inducción *in vitro* de genes de invasión en condiciones de baja concentración de oxígeno refleja la situación *in vivo* en las que estos genes se expresan, es decir, el ambiente propio del tracto intestinal. Por lo tanto, el metabolismo anaeróbico parece ser de extrema importancia para patógenos y para la patogénesis (Filiatrault *et al.*, 2006; Fink *et al.*, 2007; Troxell *et al.*, 2011b).

En *S. Typhimurium* se describió que esta especie posee la capacidad de producir durante el proceso inflamatorio un nuevo aceptor de electrones (tetrionato), siendo la misma capaz de utilizarlo para el proceso de obtención de energía y así competir con la flora intestinal, cuyos organismos obtienen energía a través del proceso fermentativo (Winter *et al.*, 2010). La proteína Fur posee un papel central en la regulación de la virulencia en *Salmonella* en condiciones de aerobiosis (Troxell *et al.*, 2011b) como también de anaerobiosis (Troxell *et al.*, 2011a).

1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS AL NUCLEOIDE

En las células procariotas, el genoma bacteriano no compactado presenta una longitud muy superior al tamaño celular, por lo que es necesario su empaquetamiento y condensación en una estructura que se denomina nucleoide bacteriano. En el caso de *E. coli* la acción combinada de diversos factores tales como el superenrollamiento del ADN y las proteínas asociadas al nucleoide, permite que el cromosoma ocupe apenas una cuarta parte del volumen celular (Dame, 2005). Esta compleja estructura es capaz de conciliar la necesidad de empaquetar la gran cantidad de ADN con el requerimiento de la célula de replicarse y regular la expresión génica en respuesta a cambios rápidos de las condiciones nutricionales y ambientales.

Las proteínas asociadas al nucleoide poseen un papel central en la organización, replicación, segregación, reparación y expresión del cromosoma bacteriano (Browning *et al.*, 2010). Determinadas proteínas asociadas al nucleoide también regulan el inicio de la transcripción de determinados promotores y, junto con factores de transcripción, regulan la expresión génica en respuestas al crecimiento y a los cambios en las condiciones ambientales (Browning *et al.*, 2010). En *E. coli* se han descrito diferentes proteínas asociadas al nucleoide o NAPs (*Nucleoid Associated Proteins*) (Azam & Ishihama, 1999; Dillon & Dorman, 2010). Algunas de las NAPs mejor estudiadas son HU (*Heat-Unstable Nucleoid Protein*), IHF (*Integration Host Factor*), H-NS (*Histone-like Nucleoid-Structuring Protein*), StpA (*Supresor of td-mutant phenotype A*), Lrp (*Leucine-responsive regulatory protein*), FIS (*Factor for Inversion Stimulation*), y Dps (*DNA-Binding Protein from starved cells*). Todas las NAPs se unen al ADN. Existen NAPs que se unen al ADN curvado como HU, otras a secuencias de ADN ricas en AT (adenina y tiamina) como H-NS y StpA, y otras que se unen de forma específica a una

secuencia consenso como, por ejemplo, IHF y Lrp (revisado por (Dillon & Dorman, 2010)).

La concentración de estas proteínas en el citoplasma celular varía dependiendo de las condiciones de crecimiento celular y de la fase de crecimiento (Fig. 1.2). Por ejemplo, Fis parecer ser más abundante en fase exponencial, mientras que IHF y Dps se expresan más en fase estacionaria (Azam & Ishihama, 1999; Dillon & Dorman, 2010).

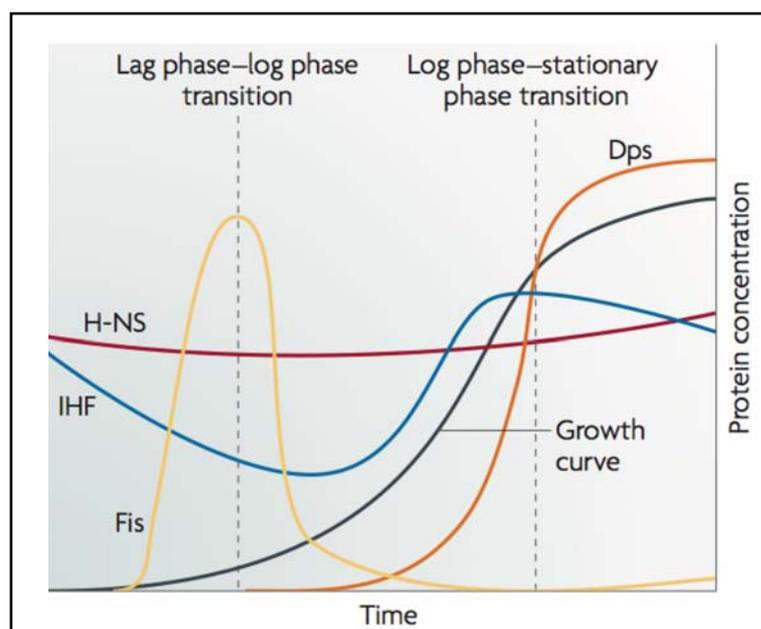


Figura 1.2. Patrón de expresión de las cuatro principales NAPs al largo del crecimiento bacteriano. En el eje X se indica el tiempo de cultivo, y en el eje Y se indica tanto el crecimiento como las concentraciones de las cuatro NAPs estudiadas. En azul se indica la proteína IHF, en rojo la proteína H-NS, en amarillo la proteína Fis, y en naranja la proteína Dps. En verde oscuro se presenta la curva de crecimiento al largo del tiempo. Adaptado de (Dillon & Dorman, 2010)

Las NAPs mejor caracterizadas son HU, IHF, Lrp, Fis y H-NS. De las mismas cabe resaltar algunas características:

- HU: la proteína HU está compuesta por dos subunidades, HU α y HU β , las cuales comparten una identidad de 70% en la secuencia aminoacídica. En *E. coli* y *S. Typhimurium*, HU existe en las formas de homodímeros o heterodímeros, las cuales son dependientes del crecimiento bacteriano (Claret & Rouviere-

Yaniv, 1997). La interacción de la proteína HU con el ADN parece ser inespecífica, pero se sabe que existe una preferencia de unión a regiones donde el ADN se presenta distorsionado, tal como curvaturas (Castaing *et al.*, 1995). Parece ser que la proteína HU actúa en los procesos de recombinación y topología del ADN (Broyles & Pettijohn, 1986; Dillon & Dorman, 2010). HU parece influenciar la expresión de varios genes en *E. coli*, entre algunos, aquellos involucrados en metabolismo y respiración (Oberto *et al.*, 2009). HU parece también contribuir en la flexibilidad del ADN al doblar las cadenas del mismo y facilitar la formación de bucles, los cuales son importantes para la regulación génica y la arquitectura del cromosoma (Becker *et al.*, 2007).

- IHF: la proteína IHF fue primeramente caracterizada como un cofactor en la recombinación específica de lugar del bacteriófago λ . Las proteínas IHF y HU comparten similitudes en la secuencia aminoacídica, pero poseen distintas maneras de interactuar con el ADN (Dillon & Dorman, 2010). Aunque HU se une al ADN de una manera no específica en secuencia, IHF se une a una secuencia consenso [(A/T)ATCAANNNTT(G/A)], y es capaz de realizar un giro formando una U al ADN (Hales *et al.*, 1994; Swinger & Rice, 2004). En *E. coli* y *S. Typhimurium*, IHF está compuesta por dos subunidades, α y β . Normalmente la forma activa de la proteína se presenta en heterodímeros $\alpha\beta$, aunque datos recientes de un análisis transcripcional de *S. Typhimurium* revelaron que las formas homodiméricas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ también poseen actividad biológica (Mangan *et al.*, 2006). IHF influencia la transcripción global en *E. coli* y *S. Typhimurium* (Arfin *et al.*, 2000; Mangan *et al.*, 2006) a través de la capacidad de doblar el ADN facilitando el contacto entre las proteínas reguladoras y la ARN polimerasa (Santero *et al.*, 1992). IHF es un componente esencial en los procesos de recombinación específica de lugar y en la transposición del ADN (Dillon & Dorman, 2010; Haniford, 2006).
- Lrp: la proteína Lrp influencia la transcripción de aproximadamente 10% de los genes de *E. coli* y, dependiendo del gen diana, la actividad de Lrp puede ser potenciada, inhibida o no afectada por la presencia de leucina (Cho *et al.*, 2008a). Lrp regula la transcripción de genes involucrados en la absorción de

nutrientes y metabolismo de aminoácidos (Dillon & Dorman, 2010). No obstante, Lrp también está involucrada en la regulación de genes asociados a virulencia, regulando la variación de fase en la expresión de pili (Dillon & Dorman, 2010). Intracelularmente Lrp se presenta de varias maneras: en forma dimérica, octamérica y hexadecamérica. La presencia de leucina favorece la disociación de la forma hexadecamérica a octamérica (Chen & Calvo, 2002). Lrp influencia la expresión de ARN ribosómicos (ARNr) en *E. coli* al cooperar con H-NS en la represión de la transcripción de los mismos (Pul *et al.*, 2007).

- Fis: la proteína Fis fue ampliamente estudiada debido a su implicación en la organización y/o regulación del genoma bacteriano (Dillon & Dorman, 2010). Fis posee papeles centrales en la regulación transcripcional en *E. coli* y *S. Typhimurium* (Bradley *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2004). Normalmente Fis se asocia en forma de homodímeros y se une a una secuencia consenso rica en A/T (adenina/timina) de aproximadamente 17 pares de bases, excepto en las posiciones 2 y 16, donde normalmente se encuentra una G o C (guanina o citosina) (Cho *et al.*, 2008b). Fis participa en la modulación de procesos celulares tales como transcripción, replicación y recombinación del ADN (Dorman, 2009). No obstante, Fis puede activar o reprimir la expresión de genes dependiendo de la posición de las cajas de unión de la misma si coinciden con los sitios de unión de la ARN polimerasa (Dillon & Dorman, 2010). Fis también puede actuar como activador transcripcional al contactar físicamente con la ARN polimerasa (McLeod *et al.*, 2002). Actualmente se está considerando a Fis como un regulador importante de genes de virulencia de patógenos bacterianos. Promueve la transcripción de genes de invasión de *Shigella flexneri* (Falconi *et al.*, 2001) y *S. Typhimurium* (Wilson *et al.*, 2001).

Por lo que la proteína H-NS se refiere, su importancia dentro de este trabajo hace que se le dedique un capítulo entero de esta introducción.

El papel de cada una de estas proteínas en la estructuración del nucleóide no está totalmente clarificado. Su efecto sobre la topología del ADN puede variar en función de las condiciones ambientales. Asimismo, la función en la estructuración del nucleóide de cada una de ellas puede ser reemplazada por la acción de otras proteínas. En general se

puede decir que las proteínas asociadas al nucleóide se agrupan en dos grupos: las que curvan el ADN, como Fis, IHF y HU, y las que forman puentes entre distintos dúplex de ADN, como H-NS y Lrp (Dame, 2005; Dillon & Dorman, 2010). La organización de estas proteínas dentro de los bucles de ADN es importante tanto para la compactación del cromosoma como para la modulación de la transcripción. En la figura 1.3 se muestra de forma esquemática el efecto de las NAPs mejor caracterizadas sobre la estructuración de un ADN plasmídico.

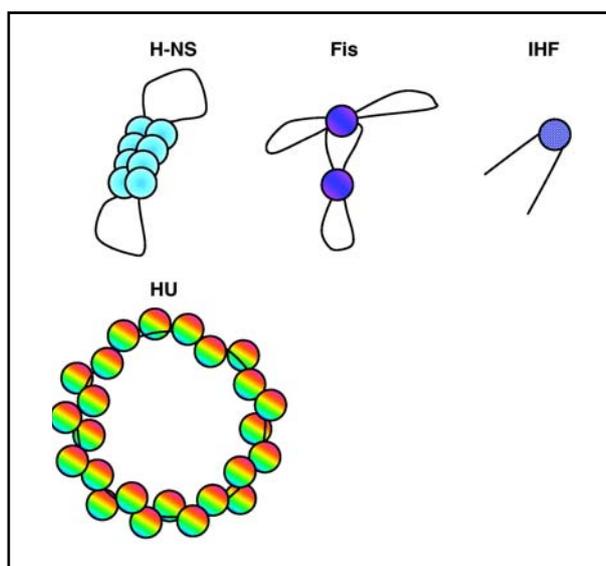


Figura 1.3. Efecto de las proteínas asociadas al nucleóide H-NS, Fis, IHF y HU en la estructuración de un ADN plasmídico. A elevadas concentraciones H-NS forma puentes entre dos cadenas de ADN. La unión de Fis promueve la formación de dominios en el ADN superenrollado. La unión de IHF promueve la formación de bucles en forma de U en el ADN. A elevadas concentraciones, HU se agrega a lo largo del ADN formando un filamento de ADN-HU. Adaptado de (Browning *et al.*, 2010).

1.4. LA PROTEÍNA H-NS

Proteínas tipo H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias gram-negativas (Bertin *et al.*, 1999; 2001; Dillon & Dorman, 2010; Tendeng & Bertin, 2003). Representantes de esta clase de proteínas se encuentran no sólo en γ -proteobacterias, sino también en α -proteobacterias, como es

el caso de *Silicibacter pomeroyi*, y β -proteobacterias, como la proteína BpH3 de *Bordetella pertussis* (Goyard & Bertin, 1997).

La proteína H-NS fue inicialmente, caracterizada en la década de 1970 como un factor proteico termoestable, el cual estimulaba la transcripción *in vitro* del ADN en condiciones limitantes de ARN polimerasa (Jacquet *et al.*, 1971). En paralelo a esos estudios, en los años ochenta diferentes grupos de investigación pusieron de manifiesto que mutaciones en el locus *hns* tenía como consecuencia un efecto pleitrópico en la fisiología bacteriana, específicamente en los procesos celulares de adaptación a los cambios de temperatura, osmolaridad y pH (Dorman *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1988; May *et al.*, 1990). La proteína H-NS ha sido desde entonces estudiada principalmente en *E. coli* y *S. Typhimurium*, donde interviene en la organización del nucleoide y en la expresión de genes involucrados en la adaptación a cambios ambientales (Dillon & Dorman, 2010; Schröder & Wagner, 2002). Es una proteína termoestable y de pequeña masa molecular (aproximadamente 15,6 KDa) y muy abundante intracelularmente (Azam & Ishihama, 1999). Los niveles de expresión de la proteína H-NS se mantienen constantes a lo largo de las distintas fases de crecimiento bacteriano (Schröder & Wagner, 2002), aunque hay autores que consideran que se produce un ligero incremento en sus niveles en el inicio de la fase estacionaria (Dersch *et al.*, 1993) y otros que consideran que lo que se produce es una disminución de sus niveles en esta fase del crecimiento (Azam *et al.*, 2000). Estos niveles también permanecen constantes en crecimientos a 25°C y a 37°C, aunque modulan de forma distinta la expresión de los genes que están bajo su influencia (Göransson *et al.*, 1990).

El gen *hns* se encuentra localizado en el minuto 27,8 del cromosoma de *E. coli* y es un gen de copia única. Se transcribe independientemente de los genes que lo flanquean y se autorregula negativamente a nivel de la transcripción (Dersch *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1993; Hulton *et al.*, 1990; Ueguchi *et al.*, 1993). Las proteínas asociadas al nucleoide Fis y Csp pueden activar la expresión de *hns* (Falconi *et al.*, 1996). La expresión de *hns* se induce por choque frío a través de la proteína CspA (La Teana *et al.*, 1991) y por aumento de la presión hidrostática (Welch *et al.*, 1993). Además la producción de H-NS está vinculada al ciclo celular a través de una correlación positiva entre la transcripción del gen *hns* y la replicación del cromosoma (Free & Dorman, 1995), mecanismo de regulación por el cual los niveles de H-NS se mantendrían más o menos constantes a lo largo del crecimiento.

La proteína H-NS ejerce un papel muy importante no sólo en la regulación de la expresión génica sino también en la estabilidad del cromosoma (Atlung & Hansen, 2002), donde se dispone de manera más o menos uniforme (Azam *et al.*, 2000). Al contrario de los típicos reguladores transcripcionales que reconocen secuencias específicas, la unión de H-NS al ADN es independiente de secuencia, aunque preferentemente se une a regiones curvadas que son regiones ricas en nucleótidos A y T (Bracco *et al.*, 1989; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1990). Estudios recientes han permitido identificar una secuencia consenso de ADN (TCGATATATT) a la cual H-NS parece tener preferencia en unirse con mayor afinidad que a otras secuencias ricas en A y T (Lang *et al.*, 2007). No obstante también puede provocar la curvatura en ADN no curvado (Spurio *et al.*, 1997). En *E. coli* existe un gran número de genes que presentan estructuras curvadas en sus respectivos promotores (Bracco *et al.*, 1989). Entre los varios ejemplos encontrados en *E. coli*, se destaca el gen *proU*, el cual posee estas regiones, denominadas DRE (*Downstream Regulatory Element*) tras el promotor (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Recientemente se caracterizó la presencia de estos elementos DRE en el promotor del gen *hilA* de *S. Typhimurium* (Olekhovich & Kadner, 2006), los cuales poseen un papel importante en la regulación por H-NS.

La proteína H-NS está implicada en la regulación de distintos factores de virulencia de cepas de *E. coli* como, por ejemplo, en los patotipos de *E. coli* uropatogénicas (Göransson *et al.*, 1990; Madrid *et al.*, 2002b), enterotoxigénicas (Trachman & Maas, 1998) y enteroagregativas (Morin *et al.*, 2010). No obstante, también regula diversos factores de virulencia en otras especies como *S. flexneri* (Maurelli & Sansonetti, 1988), *S. Typhimurium* (Higgins *et al.*, 1988; Olekhovich & Kadner, 2006; 2007) y *V. cholerae* (Nye *et al.*, 2000).

Es destacable que en otras especies bacterianas no se ha podido caracterizar el papel regulador de H-NS, ya que no ha sido posible obtener cepas mutantes para el gen *hns* como, por ejemplo, *Proteus mirabilis* (Coker *et al.*, 2000), *Bordetella bronchiseptica* (Goyard & Bertin, 1997), *Yersinia pseudotuberculosis* (Heroven *et al.*, 2004) o *Yersinia enterocolitica* (Baños *et al.*, 2008). No obstante, en este último caso, la inhibición parcial de H-NS ha podido poner de manifiesto la importancia de esta proteína en *Yersinia*.

1.4.1 Dominios estructurales de la proteína H-NS

La proteína H-NS presenta dos dominios estructurales independientes que corresponden a los dominios funcionales. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de dimerización/oligomerización, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión a ácidos nucleicos, ambos dominios están conectados por una región conectora (*linker*) que permite la actuación de forma independiente de ambos dominios (Badaut *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003; Dorman *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2002) (Fig. 1.4A). Primeramente determinaron la estructura tridimensional de ambos dominios de la proteína H-NS por separado, y recientemente determinaron la estructura en el estado de oligómero (Fig. 1.4B), (Arold *et al.*, 2010).

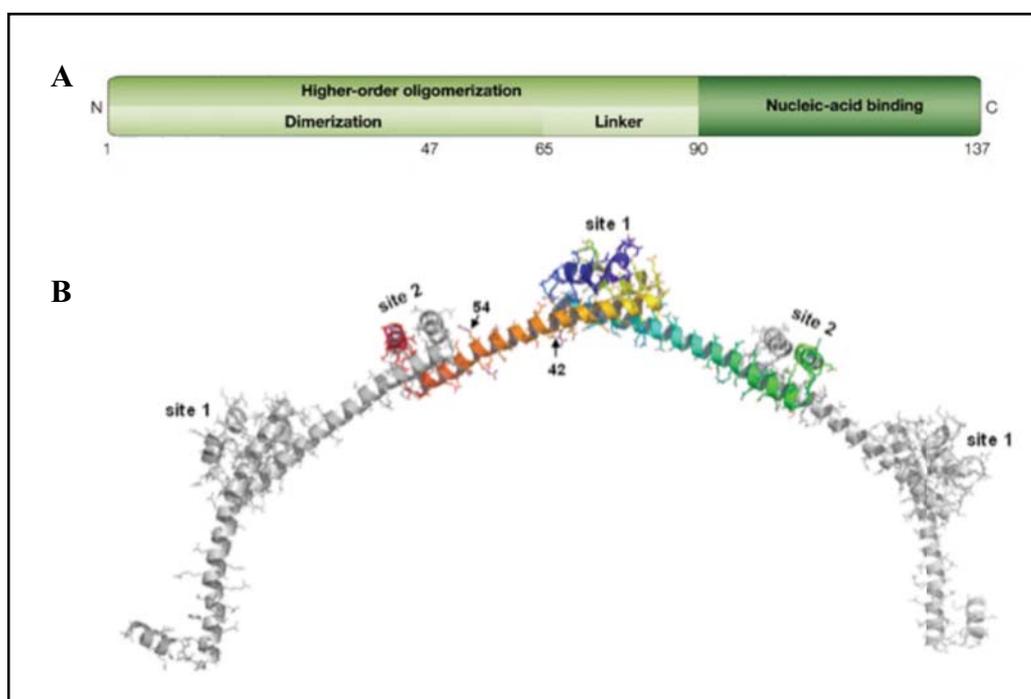


Figura 1.4. Representación esquemática de los dominios funcionales encontrados en la proteína H-NS. A) En el extremo N-terminal se indica el dominio de oligomerización, dividido en el dominio de dimerización (aminoácidos 1 al 64) y la región flexible (aminoácidos 65 al 89), y en el extremo C-terminal se indica el dominio de unión al ADN. Adaptado de (Dorman, 2004). B) Estructura de un oligómero de la proteína H-NS, en color se presenta uno de los dímeros. Adaptado de (Arold *et al.*, 2010).

Para poder realizar sus funciones biológicas, la proteína H-NS requiere la oligomerización en estructuras más complejas que dímeros. Para esto, es necesaria además del dominio de oligomerización, la presencia de la región conectora, ya que proteínas truncadas de H-NS (aminoácidos 1 al 65, ver figura 1.4) no son capaces de formar oligómeros mayores (Smyth *et al.*, 2000). Todavía no está claro el estado de oligomerización que la proteína H-NS presenta intracelularmente. Algunos estudios sugieren que la forma predominante son dímeros o estructuras oligoméricas siempre de números pares (Smyth *et al.*, 2000; Ueguchi *et al.*, 1993). El dominio N-terminal o dominio de oligomerización de H-NS presenta 3 estructuras de α hélices, $\alpha 1$ (aminoácidos 2-7), $\alpha 2$ (11-18) y $\alpha 3$ (22-46). Aunque este dominio se presenta bastante conservado entre los distintos miembros de la familia de proteínas H-NS, su grado de conservación es menor que el dominio C-terminal de unión a ácidos nucleicos (Tendeng & Bertin, 2003). Esta variabilidad está determinada por las distintas adaptaciones específicas de las bacterias que presentan estas proteínas, como puede ser la adaptación a baja temperatura (Tendeng *et al.*, 2003b), o la diferente especificidad o afinidad de interacción con otras proteínas o el ADN (Bloch *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que el estado de dimerización de la proteína H-NS se debe al estado de la proteína a diferentes temperaturas (Ono *et al.*, 2005). La estructura secundaria sería básicamente la misma a diferentes temperaturas, pero no la disposición de dímeros y oligómeros (Fig. 1.5). La conformación de H-NS a elevada temperatura facilitaría la formación de dímeros. Las estructuras propuestas serían capaces de unirse al ADN, pero el hecho de que a elevada temperatura predominen los dímeros, y que los mismos no son capaces de formar oligómeros de orden mayor, generaría una mayor inestabilidad de la unión H-NS-ADN, y obviamente esta situación facilitaría el acceso de la ARN polimerasa (Ono *et al.*, 2005).

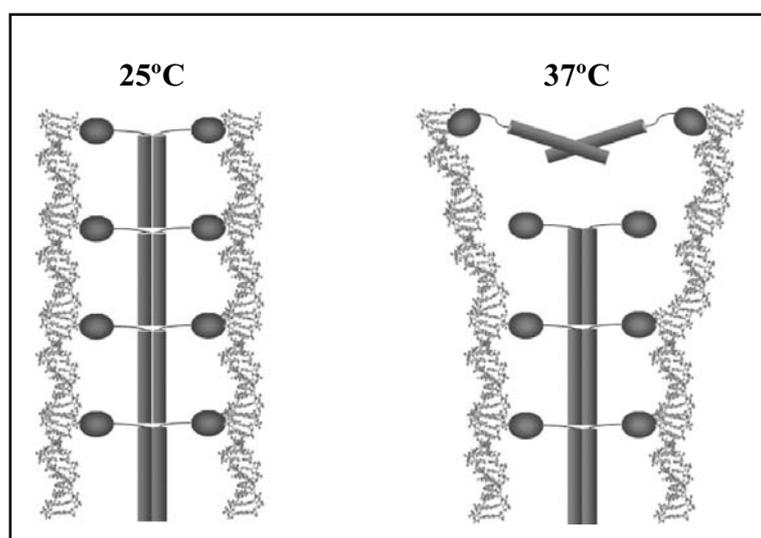


Figura 1.5. Cambios estructurales de la proteína H-NS (al centro en gris oscuro) en respuesta a un aumento de temperatura. Adaptado de (Ono *et al.*, 2005).

El proceso de oligomerización se inicia con la formación de la unidad estructural dimerica, la cual es dependiente de la concentración, temperatura y el tipo de catión del medio (Smyth *et al.*, 2000). A continuación se forman los oligómeros, el número de unidades de los cuales es proporcional a la concentración. Aunque el dominio N-terminal es el responsable del proceso de oligomerización, está demostrado que los 20 primeros aminoácidos de este dominio poseen también la capacidad de represión o silenciamiento genético (Dorman, 2004). Además, esta región participaría también juntamente con el dominio C-terminal en el reconocimiento de las regiones curvadas del ADN y, por lo tanto, en la unión al ADN (Dorman, 2004). El dominio de oligomerización de H-NS le permite interactuar no sólo con otra copia de sí misma sino también con otras proteínas que muestren este mismo dominio (Dorman *et al.*, 1999). Esta formación de heterómeros permite una diferente modulación de la expresión génica. El heterómero mejor caracterizado es el que se establece entre H-NS y su proteína paróloga StpA (Williams *et al.*, 1996). Esta interacción estabiliza la proteína StpA una vez que la misma esta sujeta a degradación por la proteasa Lon (Johansson *et al.*, 2001). No obstante, la proteína H-NS también interacciona con el regulador post-transcripcional Hfq (chaperona de ARN) que, juntamente con DrsA, participan en la regulación del gen *rpoS* (Muffler *et al.*, 1996), con el producto génico 5.5 del fago T7, que suprime la actividad inhibitoria de H-NS en la transcripción tanto *in vitro* como *in vivo* (Liu & Richardson, 1993), y con la proteína motora flagelar FliG (Dorman, 2004). H-NS también interacciona con proteínas de la familia Hha/YmoA (Nieto *et al.*, 2000; 2002) (ver más adelante).

En el extremo C-terminal de la proteína H-NS se encuentra el dominio de unión al ADN (aminoácidos 90 al 137, figura 1.4) (Shindo *et al.*, 1995). La comparación de secuencias de proteínas de la familia H-NS muestra un motivo presente en esta región (aminoácidos 108 al 1167, figura 1.4) que contiene residuos altamente conservados, TWTGXGRXP, donde X puede ser cualquier aminoácido (Dorman *et al.*, 1999). El triptófano (W) en posición 109 parece estar íntimamente relacionado con la interacción con el ADN (Tippner & Wagner, 1995), mientras que la prolina (P) en posición 116 está relacionada con la discriminación entre regiones curvadas y no curvadas del ADN (Spurio *et al.*, 1997). Aún así, en distintas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, tanto el triptófano 109 como la prolina 116 no se encuentran conservados y la proteína H-NS de estas especies es capaz de complementar algunos fenotipos en un mutante *hns* de *E. coli* (Tendeng *et al.*, 2003a). El aminoácido tirosina (Y) en posición

97, así como la glicina (G) en posición 127, son residuos que también se encuentran altamente conservados en las distintas proteínas relacionadas con H-NS (Tendeng & Bertin, 2003).

1.4.2 Modulación de la expresión génica por la proteína H-NS

La proteína H-NS es considerada un modulador global de la expresión génica. H-NS responde a cambios ambientales que afectan los perfiles transcripcionales de manera directa o indirecta, de aproximadamente el 5% de los genes de *E. coli* (Hommais *et al.*, 2001).

Existen varios mecanismos propuestos por los cuales la proteína H-NS modularía la expresión génica (Dillon & Dorman, 2010; Dorman, 2004). Por un lado, H-NS se podría unir a secuencias curvadas ricas en A y T y llegar a formar complejos nucleoproteicos que impedirían el acceso de la ARN polimerasa o la progresión de la transcripción, modelo este conocido como silenciamiento transcripcional (Fig. 1.6).

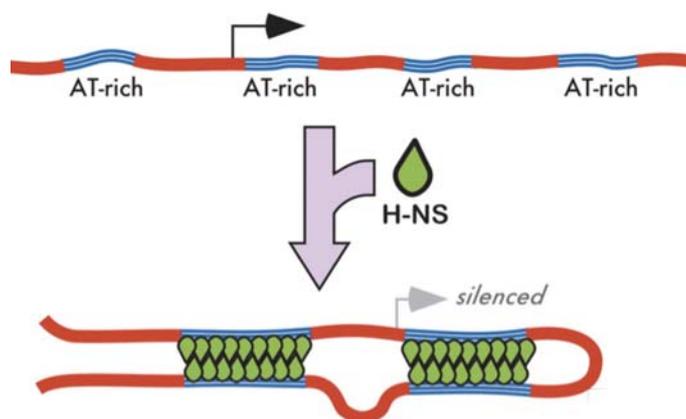


Figura 1.6. Silenciamiento transcripcional de H-NS en una secuencia de ADN rica en A y T. Adaptado de (Navarre *et al.*, 2007).

H-NS también se puede unir al ADN y llegar a causar cambios en la topología del ADN, las cuales causan una alteración de la transcripción en promotores sensibles al superenrollamiento (Mojica & Higgins, 1997). En el modelo propuesto de silenciamiento transcripcional H-NS actúa directamente como un represor transcripcional debido a su capacidad de polimerizar linealmente sobre el ADN e impedir la correcta unión de la ARN polimerasa, sea por captura o por oclusión del sitio

de unión (Williams & Rinsky, 1997). Esta represión de la transcripción por parte de H-NS no se produce de manera indefinida, sino que determinadas señales ambientales (como temperatura o osmolaridad), o diferentes factores de transcripción (como las proteínas Fis y IHF), pueden contribuir a la desestructuración de los complejos nucleoproteicos formados, y permitir la transcripción de los genes regulados. Como ejemplos podemos citar el modelo del gen *virF* de *Shigella* (Falconi *et al.*, 1998), la toxina alfa-hemolisina (Madrid *et al.*, 2002b) y el gen *rrn*, ambos de *E. coli* (Schröder & Wagner, 2000), y el gen *ssrB* de *S. Typhimurium* (Walthers *et al.*, 2007), figuras 1.7 y 1.8.

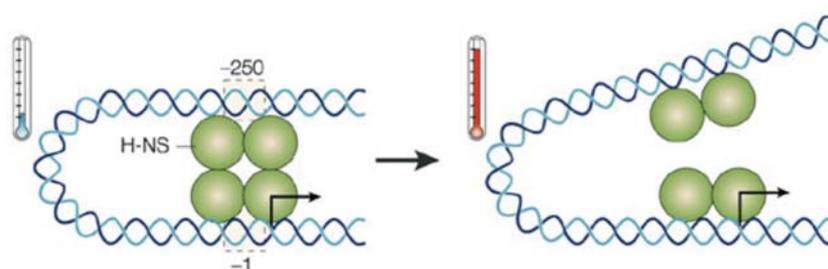


Figura 1.7. Regulación del gen *virF* de *Shigella flexneri* por la proteína H-NS. El promotor del gen *virF* presenta dos sitios de unión para la proteína H-NS. A baja temperatura, se forma un complejo nucleoproteico que impide la unión de la ARN polimerasa y, por lo tanto, la transcripción está reprimida. Un incremento de temperatura causa un cambio en la topología del ADN que conlleva a la pérdida del contacto entre las moléculas de H-NS, lo que termina en una desestabilización del complejo y a una desrepresión de la expresión. Adaptado de (Dorman, 2004).

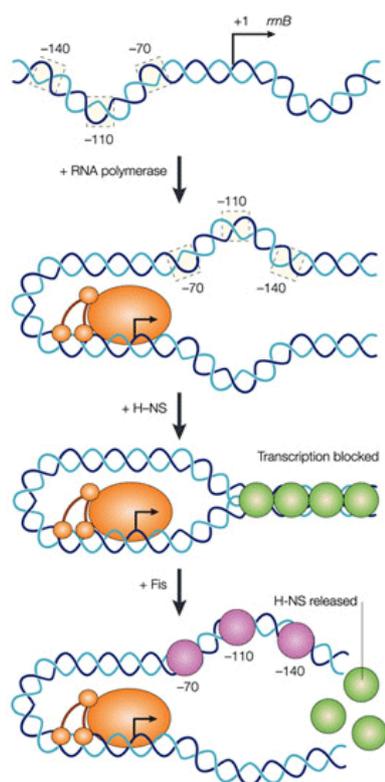


Figura 1.8. Modelo de represión de la transcripción por H-NS en el operón *rrn* de ARN ribosomal de *E. coli*. La oligomerización de la proteína H-NS al largo de determinadas regiones del ADN lleva a formación de un complejo que evita que la ARN polimerasa escape del promotor y inicie la transcripción. La proteína Fis antagoniza en este caso la represión mediada por H-NS, desestructurando el complejo y liberando la ARN polimerasa atrapada. Adaptado de (Dorman, 2004).

El modelo de represión vía topología del ADN deriva de la observación que la proteína H-NS puede actuar directamente sobre la topología del ADN y llegar a producir cambios conformacionales a nivel local. Las curvaturas causadas impiden la unión correcta al promotor de otras proteínas, factores de transcripción y sobre todo de la ARN polimerasa (Hulton *et al.*, 1990; Stoebel *et al.*, 2008). Existen varios promotores sensibles al superenrollamiento del ADN y un aumento de la flexibilidad puede promover la actividad del mismo (Tupper *et al.*, 1994). En este caso, la formación del complejo nucleoproteico H-NS/ADN podría provocar una disminución de la flexibilidad del mismo, y esta rigidez del promotor impediría que tenga lugar la transcripción del gen. Además estos complejos también evitan la formación de complejo activo entre la ARN polimerasa y la secuencia del ADN (Schröder & Wagner, 2002; Stoebel *et al.*, 2008).

H-NS puede actuar como un sensor de cambios ambientales tales como la temperatura, la osmolaridad o la anaerobiosis y regular así la expresión de diferentes genes. Además, estos factores ambientales también afectan al superenrollamiento del ADN *in vivo*. De todos los genes descritos en *E. coli* que se encuentran directa o indirectamente afectados por la proteína H-NS aproximadamente 35% forman parte de

la maquinaria celular o están regulados en función de los cambios ambientales (osmolaridad, temperatura, pH o disponibilidad de oxígeno). El 20% de estos genes están implicados en la fase o la tasa de crecimiento y codifican para proteínas implicadas en la maquinaria transcripcional o traduccional. Por otro lado, el 35% de los genes afectados por la proteína H-NS son de función desconocida, lo que indica que todavía no se tiene claro el papele regulador de la proteína H-NS (Hommais *et al.*, 2001). No obstante, en *S. Typhimurium* se ha determinado cuáles son los genes expresados diferencialmente con la respuesta a temperatura, y se ha observado que la termorregulación del 77% de estos genes depende de la proteína H-NS (Ono *et al.*, 2005).

1.4.3 La proteína H-NS como un silenciador del ADN xenogénico

La transferencia horizontal de material genético (*Horizontal Gene Transfer* – HGT) es el principal proceso por el cual las bacterias adquieren nuevos genotipos (Harrison & Brockhurst, 2012). La incorporación de ADN HGT confiere a bacteria la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes como, por ejemplo, colonizar distintos hospedadores (Elwell & Shipley, 1980; Harrison & Brockhurst, 2012; Park & Zhang, 2012). Adicionalmente también le permite adquirir nuevas características fenotípicas como, por ejemplo, resistencia a compuestos antimicrobianos (Svara & Rankin, 2011), metales pesados (Tett *et al.*, 2007) y funciones metabólicas tales como la fijación del nitrógeno en *Rhizobium* (Landeta *et al.*, 2011) o la degradación de compuestos aromáticos. El proceso de adquisición de ADN HGT puede ocurrir por tres distintos mecanismos: transformación, conjugación, y transducción (Thomas & Nielsen, 2005). En la transformación, la célula bacteriana capta el ADN directamente del ambiente externo; en la conjugación, el ADN es transferido de una célula a otra por contacto directo, y en la transducción, un bacteriófago transfiere el ADN de una célula a otra. El ADN HGT presenta características específicas en la composición de los nucleótidos y en el uso de codones (*codon usage*), lo que difiere del genoma del organismo hospedador. Normalmente el ADN HGT presenta un elevado porcentaje de los nucleótidos A y T (adenina y tiamina) (Daubin *et al.*, 2003; Lawrence & Ochman, 1997; Navarre *et al.*, 2007).

Análisis de genómica comparativa determinaron que la cepa de *S. Typhimurium* LT2 ha incorporado por transferencia horizontal de ADN durante el proceso evolutivo

del ancestro común de *E. coli* y *Salmonella* (Porwollik & McClelland, 2003) más de 200 regiones genómicas las cuales presentan más de 100 pares de bases de tamaño. Estas regiones genómicas equivalen a $\frac{1}{4}$ del material genético total de esta especie (Porwollik & McClelland, 2003). Varias regiones genómicas de *S. Typhimurium* adquiridas vía HGT están involucradas en la virulencia, pero a muchas de ellas no se les ha atribuido ninguna función (Navarre *et al.*, 2007).

Aunque la transferencia horizontal de ADN posee un papel clave en la evolución microbiana, secuencias de ADN foráneas pueden causar una disminución del “*fitness*” en la bacteria receptora, ya sea por la integración del ADN en determinadas regiones funcionales del genoma, o por incorporar genes que alteren la regulación de la célula receptora (Navarre *et al.*, 2007). En el caso de que la adquisición de ADN HGT proporcione a la célula alguna función de utilidad, también se puede producir un impacto negativo debido a que las nuevas adquisiciones no estén integradas en los circuitos de regulación de la bacteria (Navarre *et al.*, 2007).

Estudios recientes revelaron que la proteína H-NS posee un papel esencial en la protección de la célula bacteriana frente a los posibles efectos perjudiciales derivados de la transferencia horizontal de genes a través del reconocimiento y silenciamiento de secuencias con un contenido en G y C significativamente inferior al del genoma bacteriano (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Pflum, 2006). Este fenómeno, denominado silenciamiento xenogénico, es el primer mecanismo de control de material genético adquirido horizontalmente que ha sido descrito después del descubrimiento de las enzimas de restricción hace más de 40 años (Navarre *et al.*, 2007). Este sistema facilita la adquisición de ADN externo y permite que la célula adquiera nuevas funciones como determinantes de virulencia y/o resistencia a antibióticos sin comprometer el *fitness* celular (Navarre *et al.*, 2007), (Fig. 1.9).

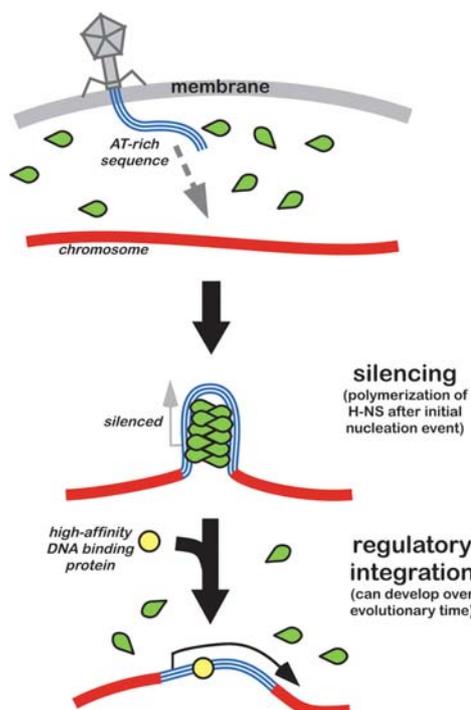


Figura 1.9. Adquisición de ADN foráneo facilitado por el silenciamiento xenogénico. La unión de H-NS a las secuencias ricas en A y T silencian la expresión del mismo. Determinadas condiciones o la intervención de proteínas específicas podrían desencadenar la expresión de este ADN foráneo. Adaptado de (Navarre *et al.*, 2007).

1.4.3.1 Antagonismo en la represión de H-NS sobre ADN xenogénico

El modelo de silenciamiento de ADN xenogénico puede explicar cómo secuencias foráneas son selectivamente silenciadas por H-NS. No obstante, resta saber cómo este ADN se integra en las redes reguladoras de la célula bacteriana y cómo se expresa en determinadas condiciones. Datos recientes corroboran que varios genes regulados por H-NS también son controlados por otros reguladores globales como: Lrp, Fis, IHF, CRP-cAMP, ppGpp, y σ^S (Dillon & Dorman, 2010; Navarre *et al.*, 2007).

El proceso de desestabilización y/o desrepresión de H-NS sobre el ADN HGT es denominado mecanismo de antagonismo o contra-silenciamiento (Navarre *et al.*, 2007) (Fig. 1.10). Existen cuatro posibles modelos propuestos para el antagonismo de la represión mediada por H-NS (Navarre *et al.*, 2007).

- A)** La ruptura de los complejos de H-NS a causa de la multimerización de antagonistas como por ejemplo la proteína H-NSt (proteína H-NS truncada que posee una actividad antagonista frente a H-NS, (Williamson & Free, 2005) o de la proteína 5.5 del bacteriófago T7.
- B)** La competencia por la unión al ADN de proteínas de unión específica con una alta afinidad por el ADN, como por ejemplo las proteínas ToxT o RovA.

- C) La activación de determinados promotores como el caso del promotor *spv* de *S. Typhimurium* o del promotor *hdeAB* de *E. coli* por el factor sigma alternativo σ^S . La asociación de la ARN polimerasa con el σ^S podría selectivamente activar genes xenogénicos bajo determinadas condiciones de estrés, condiciones estas consideradas favorables para la expresión de los mismos.
- D) Las distintas alteraciones en la topología del promotor causadas por proteínas de unión al ADN o cambios ambientales, que rompen la formación de los complejos H-NS, como por ejemplo el promotor *virF* de *Shigella*.

Estos mecanismos no son excluyentes entre ellos y es posible que exista más de un mecanismo que pueda estar actuando de manera conjunta en determinados promotores (Navarre *et al.*, 2007).

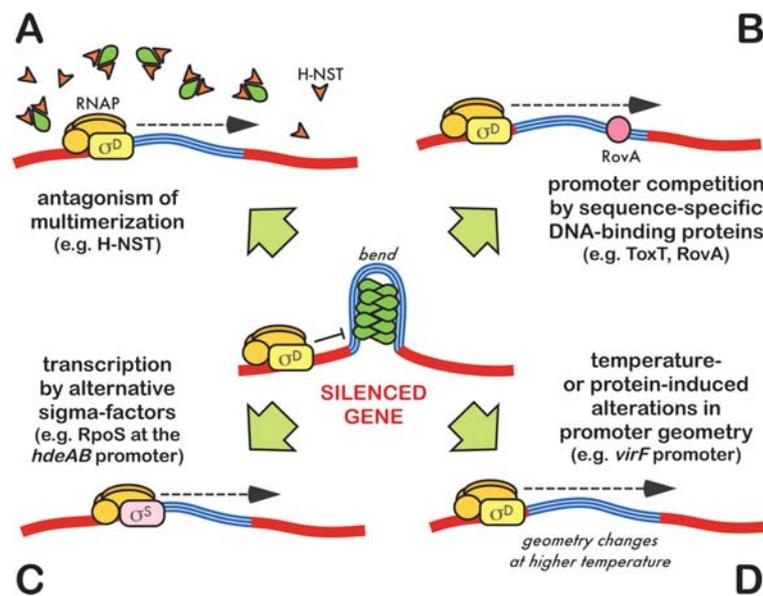


Figura 1.10. Mecanismos propuestos de los distintos efectos antagonistas en la represión mediada por la proteína H-NS. Adaptado de (Navarre *et al.*, 2007).

1.5 LA FAMILIA DE PROTEÍNAS Hha/YmoA

La familia de proteínas Hha/YmoA está constituida por un grupo de proteínas de pequeña masa molecular (aproximadamente 8 kDa), que presentan alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos y que están involucradas en la regulación génica en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Cornelis *et al.*, 1991; Madrid *et al.*, 2007; Mouriño *et al.*, 1994; Nieto *et al.*, 1991; Paytubi *et al.*, 2011). Estos microorganismos pueden presentar más de una copia del respectivo gen que codifica para estas proteínas, y esto puede suceder tanto en el cromosoma como en elementos genéticos transmisibles como es el caso de plásmidos (revisado por Paytubi *et al.*, 2011).

Los primeros miembros descritos de esta familia fueron las proteínas Hha (*High Hemolytic Activity*) en *E. coli* y YmoA (*Yersinia Modulator A*) de *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1991). Estas dos proteínas presentan un alto grado de similitud en secuencia aminoacídica (82%) (Paytubi *et al.*, 2011). Además, comparten propiedades comunes como, por ejemplo, modular la expresión de factores de virulencia. La proteína Hha fue inicialmente caracterizada en *E. coli* como un modulador de la expresión de la toxina alfa-hemolisina (Godessart *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1991). Los fenotipos pleiotrópicos exhibidos por los mutantes *hha* e *ymoA* incluyen alteraciones en el superenrollamiento de ADN plasmídico (Carmona *et al.*, 1993) y aumento en la transposición de elementos IS (Balsalobre *et al.*, 1996; Mikulskis & Cornelis, 1994).

A nivel estructural la proteína Hha presenta motivos de hélice-giro-hélice (Fig. 1.11), (Yee *et al.*, 2002). Estos motivos son típicos de proteínas bacterianas con dominios de unión al ADN, pero la proteína Hha no se une al ADN con afinidad (Nieto *et al.*, 1991). El gen *hha* presenta sus niveles de transcripción y expresión más elevados en la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Factores ambientales como osmolaridad del medio y temperatura, afectan los niveles intracelulares de Hha (Mouriño *et al.*, 1998). Por lo tanto, en respuesta a cambios ambientales, Hha puede afectar la expresión de diferentes genes. Además de la toxina alfa-hemolisina, la proteína Hha modula, entre otros, el regulador HilA de la isla 1 de patogenicidad de *Salmonella* (SPI1) (Fahlen *et al.*, 2001), y el operón *esp* de *E. coli* enterohemorrágica (Sharma & Zuerner, 2004). La proteína YmoA, paróloga de Hha en *Y. enterocolitica*, está considerada una proteína determinante en la regulación de la virulencia en esta

especie (Cornelis *et al.*, 1991). YmoA también responde a cambios ambientales como temperatura y osmolaridad, regula la producción de la proteína Yop y la adhesina YadA en *Y. enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1991; Mikulskis & Cornelis, 1994). Modula también la expresión de la invasina en *Y. enterocolitica* (Ellison *et al.*, 2003) y el sistema de secreción del tipo III en *Y. pestis* (Jackson *et al.*, 2004). Recientemente se ha puesto de manifiesto que YmoA participa conjuntamente con las estructuras de termómetros de ARN en la termorregulación del gen *lcrF* en *Y. pseudotuberculosis* (Böhme *et al.*, 2012).

Tal y como ha sido comentado anteriormente, algunos miembros de las enterobacterias presentan más de una copia de los genes tipo *hha* (Paytubi *et al.*, 2011). Por ejemplo la proteína YdgT, paróloga de Hha, fue identificada en *E. coli* (Paytubi *et al.*, 2004), *S. Typhimurium* y *Shigella* (revisado por Paytubi *et al.*, 2011). La proteína YdgT está considerada un modulador en la represión de la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (Coombes *et al.*, 2005). Adicionalmente proteínas tipo Hha codificadas por plásmidos conjugativos pueden modular funciones específicas de los mismos como, por ejemplo, en el plásmido R27 (IncHI) las proteínas tipo Hha codificadas por este plásmido modulan la conjugación dependiente de la temperatura (Forns *et al.*, 2005a).

Estudios de los mecanismos de acción de la proteína Hha fueron realizados utilizando como modelo la regulación ambiental del operón hemolítico de *E. coli* (*hlyCABD*), el cual codifica para la proteína alfa-hemolisina (Carmona *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 1991). La proteína Hha no se une directamente a la región reguladora del operón hemolítico *hlyCABD*. No obstante, se ha demostrado que Hha se une a la proteína H-NS, la cual se une a regiones específicas en este operón (Madrid *et al.*, 2002b; Nieto *et al.*, 2000). Estos resultados sugirieron la unión de las proteínas Hha y H-NS en la modulación de la expresión génica en enterobacterias (Madrid *et al.*, 2002b; Nieto *et al.*, 2000). Adicionalmente, también ha podido ponerse de manifiesto que las proteínas parálogas de Hha y H-NS en *E. coli* y *S. Typhimurium*, las proteínas YdgT y StpA, parecen también interactuar *in vitro* (Paytubi *et al.*, 2004).

La familia de proteínas Hha/YmoA parece estar más implicada en la regulación de la expresión de factores de virulencia que en la regulación de los genes *housekeeping* (revisado por Paytubi *et al.*, 2011). Estudios transcriptómicos realizados en *E. coli* y *S. Typhimurium* evidencian que los complejos formados entre H-NS-Hha modulan preferentemente genes HGT o (ADN xenogénico) (Baños *et al.*, 2009; García-Contreras *et al.*, 2008; Vivero *et al.*, 2008).

Resultados recientes han puesto de manifiesto que la proteína Hha también parece estar involucrada en otros procesos biológicos. En la cepa de *E. coli* K12 (no patógena) la regulación de la producción de biofilms parece ser sensible a la proteína Hha, la cual se expresa más en los biofilms de que en células planctónicas (García-Contreras *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2004b). Parece ser que cuando se induce, Hha reprime la formación de biofilms y desencadena la dispersión celular y lisis. Este proceso estaría mediado por las proteasas Lon, ClpX y ClpP, las cuales se inducirían a su vez por la inducción de Hha (García-Contreras *et al.*, 2008). La represión en la formación de los biofilms está mediada a través de la represión de ARNt que se sintetizan con baja frecuencia (*rare tRNA*) los cuales son utilizados en la expresión de la fimbria de tipo 1, el gen *fimA*, siendo esta fimbria la mayor responsable en formación de biofilms en *E. coli* K12 (García-Contreras *et al.*, 2008).

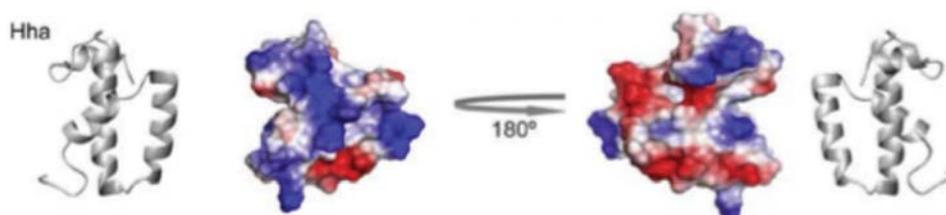


Figura 1.11. Estructura tridimensional de la proteína Hha. Adaptado de (Paytubi *et al.*, 2011).

1.6. *Salmonella enterica*

Las bacterias de la especie *Salmonella enterica* son bacilos gram-negativos pertenecientes a familia *Enterobacteriaceae*. La clasificación de los miembros del género *Salmonella* sufrió varias modificaciones a lo largo de los últimos años. Actualmente se aceptan como criterios taxonómicos la hibridación de ADN-ADN, el análisis electroforético múltiple de enzimas y el análisis comparativo de ARNr. De acuerdo con estos criterios, el género *Salmonella* se agrupa en dos grandes especies, *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). La especie *Salmonella enterica* se subdivide en seis subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Los miembros de cada subespecie se clasifican en más de 2.000 serotipos o serovares, haciendo referencia a antígenos flagelares y/o a diferencias en los carbohidratos del

lipopolisacárido (LPS) (Coburn *et al.*, 2007; Fierer & Guiney, 2001; Ochman & Groisman, 1994). Algunos serovares (Typhi y Paratyphi) están restringidos al hombre. Otros tienen un espectro amplio de huéspedes, tal como los serovares Typhimurium y Enteritidis, (Haraga *et al.*, 2008). El serovar Typhimurium es considerado un patógeno facultativo, capaz de infectar humanos. La principal vía de contaminación de este patógeno es la oral (Ahmed *et al.*, 2008; Haraga *et al.*, 2008) a través del consumo de alimentos o agua contaminados.

Una vez ingerida, *Salmonella* es capaz de sobrevivir a las condiciones de pH ácido que se encuentran en el estómago, llegando a invadir células M del epitelio del intestino delgado y posteriormente llegando a invadir leucocitos. Al llegar a los nódulos linfáticos, algunos serotipos del patógeno se pueden dispersar a órganos vitales como en el caso del bazo e hígado, y culminar con un cuadro de fiebre entérica (Fig. 1.12) (Clark *et al.*, 1994; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Jones & Falkow, 1996).

Los costes asociados a este tipo de zoonosis en países subdesarrollados y también industrializados llegan a cifras de billones de dólares, lo que hace de este patógeno un gran problema de salud pública y consecuentemente económico (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>).

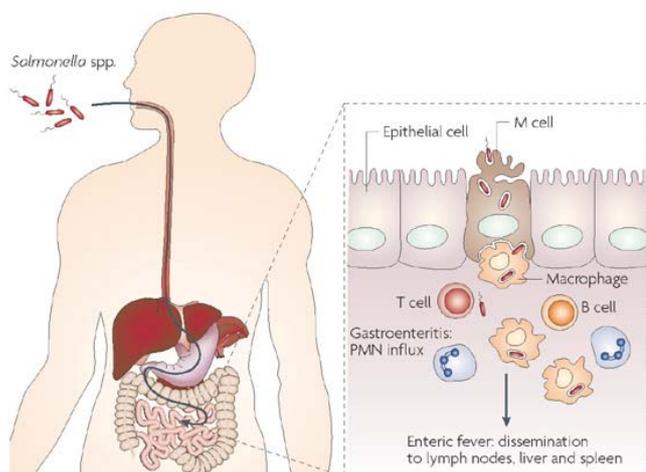


Figura. 1.12. Representación esquemática del proceso de salmonelosis. Adaptado de (Haraga *et al.*, 2008).

1.7. ISLAS DE PATOGENICIDAD (IPA)

Se denominan islas de patogenicidad (IPA) a elementos genéticos presentes en el cromosoma de un gran número de bacterias patógenas y que incluyen genes

esenciales para el proceso infeccioso (Hong & Miller, 1998). El termo IPA ha sido primeramente utilizado en los años 90, cuando se describieron dos grandes regiones inestables en el cromosoma de una cepa uropatógena de *E. coli* (Hacker *et al.*, 1990). Actualmente este término se utiliza de manera habitual para describir regiones del genoma de un patógeno las cuales no se encuentran en un comensal de la misma especie o de especies relativamente cercanas (Gal-Mor & Finlay, 2006), y que contribuyen a la virulencia.

Aunque las diferentes IPAs descritas son consideradas diversas en estructura y función, todas ellas presentan algunas características en común, tales como la presencia de genes ligados a virulencia, distinta composición del contenido de AT/GC en relación al *core genome*, asociación a genes que confieren movilidad genética (transposasas, integrasas), y se localizan adyacentes a genes que codifican para ARNt (Ahmed *et al.*, 2008; Hacker *et al.*, 1997; Schmidt & Hensel, 2004), (Fig. 1.13).

El análisis de secuencias de distintos genomas de procariontas ha revelado que existe un gran intercambio de información genética por transferencia horizontal y recombinación homóloga. Los parámetros establecidos que se tenían sobre la evolución bacteriana fueron ampliados con la información de todos los genes adquiridos horizontalmente (Dobrindt *et al.*, 2004). La pérdida y adquisición de genes juega un papel esencial en la evolución de los procariontas (Dobrindt *et al.*, 2004). Las IPAs serían un ejemplo de evolución de las bacterias patógenas con la incorporación de genes que codifican para determinantes de virulencia.

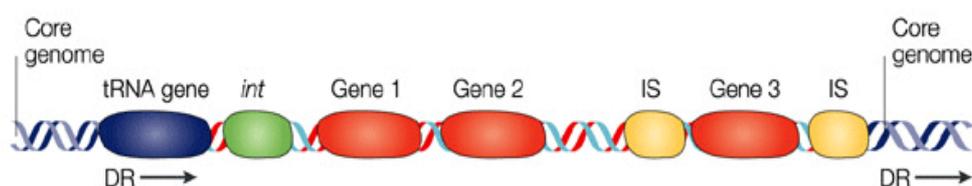


Figura. 1.13. Características generales de las islas de patogenicidad (IPAs). Típica IPA flanqueada por estructuras repetidas directas (DR), y varios genes que codifican proteínas las cuales pueden contribuir al *fitness* de la célula (genes 1 al 3, en naranja). Normalmente, las IPAs poseen varias secuencias de inserción (IS – en amarillo), u otros elementos de movilidad genética como integrasas (*int* – en verde). Adaptado de (Dobrindt *et al.*, 2004).

1.7.1. Islas de patogenicidad en *Salmonella*

En el ejemplo de *Salmonella enterica*, un número importante de factores de virulencia se encuentran codificados en genes localizados en IPAs. En *Salmonella* las IPAs son denominadas *Salmonella pathogenicity islands* (SPIs) (Mills *et al.*, 1995). Hasta el momento han sido descritas 12 SPIs distintas (Tabla 1.1), estando algunas de ellas conservadas en todo el género *Salmonella*, mientras que otras son específicas de algunos serovares (Hensel, 2004). De todas las SPIs caracterizadas, algunas poseen características de las IPAs comentadas anteriormente, pero todavía sin funciones atribuidas. La existencia de diferentes SPIs en el género *Salmonella* constituye una indicación del proceso adaptativo de una vida libre a un complejo estilo de vida como un patógeno (Hensel, 2004).

Nombre (alternativo)	Tamaño kb	% G+C	Sitio de Inserción	Distribución	Variabilidad	Funciones de virulencia
SPI-1	39,8	47	<i>flhA-mutS</i>	<i>Salmonella</i> spp.	conservado	T3SS, captación de hierro
SPI-2	39,7	44,6	ARNt <i>valV</i>	<i>S. enterica</i>	conservado	T3SS
SPI-3	17,3	47,3	ARNt <i>selC</i>	<i>Salmonella</i> spp.	variable	captación Mg ²⁺
SPI-4	23,4	44,8	tRNA-like	<i>Salmonella</i> spp.	conservado	desconocido
SPI-5	7,6	43,6	ARNt <i>serT</i>	<i>Salmonella</i> spp.	variable	T3SS efectores
SPI-6 (SCI)	59	51,5	ARNt <i>aspV</i>	serovars subesp. I	?	fimbrias
SPI-7	133	49,7	ARNt <i>pheU</i>	serovars subesp. I	inestable	antigenosVi, pilus, <i>sopE</i>
SPI-8	6,8	38,1	ARNt <i>pheV</i>	serovar Typhi	?	desconocido
SPI-9	16,3	56,7	Profago	serovars subesp. I	?	posible toxina

SPI-10	32,8	46,6	ARNt <i>leuX</i>	serovars subesp. I	?	fimbrias Sef
SGI-1	43	48,4	<i>tdhF-yidY</i>	serovars subesp. I	variable	resistencia a antibióticos
HPI	?	?	ARNt <i>asnT</i>	subesp. IIIa/b, IV	?	captación de hierro

Tabla 1.1. Características de las islas de patogenicidad encontradas en el género *Salmonella*, según (Hensel, 2004).

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se caracterizaron cinco SPIs, de las cuales las más estudiadas son SPI-1 y -2 (Fig. 1.14). Las principales características de las cinco SPIs se detallan a continuación (revisado por Schmidt & Hensel, 2004).

SPI-1: necesaria para las primeras etapas del proceso invasivo en células no fagocíticas e inducción de la respuesta inflamatoria. Codifica un sistema de secreción del tipo III (T3SS) a través del cual se liberan proteínas efectoras a la célula hospedadora.

SPI-2: necesaria para provocar una infección sistémica y para proliferar en los órganos del hospedador. Codifica un segundo sistema de secreción del tipo III, que posee un importante papel en la supervivencia dentro de macrófagos, y el establecimiento de la infección sistémica. Este segundo T3SS se expresa en el ambiente intrafagosomal y transloca las proteínas efectoras a través de la membrana vacuolar.

SPI-3: codifica un sistema de captación de magnesio de elevada afinidad (*mgtABC*), necesario para la adaptación a las limitaciones nutricionales del hábitat intrafagosomal (Dorsey *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1998).

SPI-4: en la misma se tienen caracterizados seis genes, *siiABCDEF* (*Salmonella intestinal infection*), de los cuales se sabe que SiiC, SiiD y SiiF forman un sistema de secreción del tipo I para la secreción de la adhesina SiiE, la cual se adhiere a las células epiteliales en los primeros pasos del proceso de colonización del hospedador (Morgan *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2011). No obstante, parece ser que existe una regulación coordinada entre la SPI-1 y SPI-4, donde el activador de la SPI-1, la proteína HilA, es capaz de antagonizar el efecto represor de H-NS en la SPI-4 activando la expresión de la misma (Main-Hester *et al.*, 2008).

SPI-5: se sabe que los genes localizados en esta isla son regulados por las proteínas reguladoras de las islas SPI-1 y -2 (HilA y SsrB, respectivamente) y las proteínas codificadas por esta isla son transportadas por ambos T3SS de las islas 1 y 2 (Knodler *et al.*, 2002).

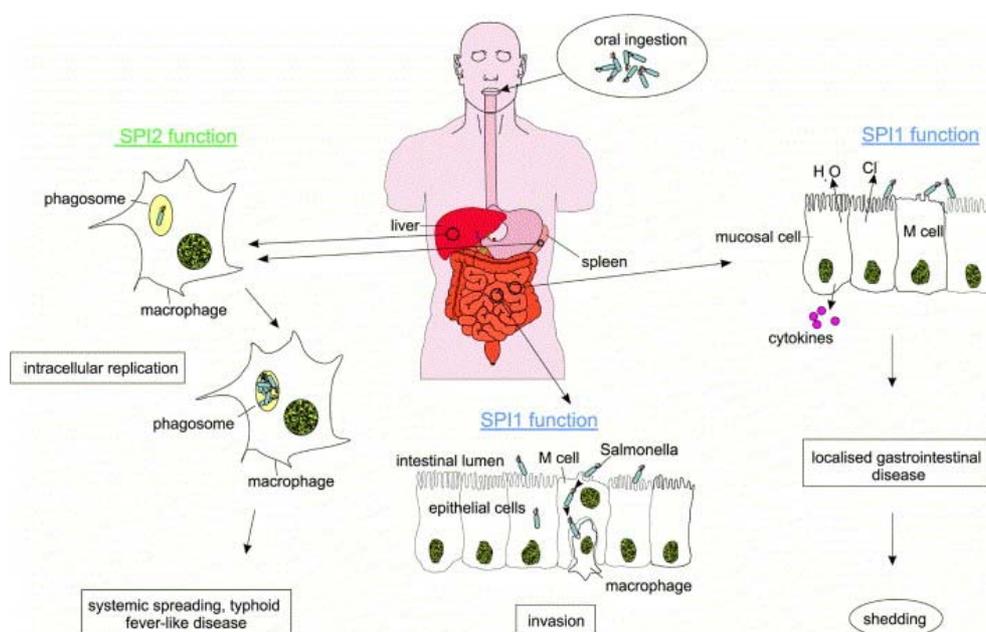


Figura. 1.14. Participación de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* en el proceso infeccioso. Adaptado de (Hansen-Wester & Hensel, 2001).

1.7.2. Isla de patogenicidad de *Salmonella* I – SPI1

SPI1 es la isla mejor estudiada y caracterizada en el serovar Typhimurium (Haraga *et al.*, 2008; Hensel, 2004). Tiene aproximadamente un tamaño de 40kb y se localiza en el centisoma 63 del cromosoma (Marcus *et al.*, 2000). Esta isla posee aproximadamente 35 genes, los cuales codifican para varios componentes de un sistema de secreción del tipo 3 (T3SS), así como también para proteínas secretadas efectoras y diferentes proteínas reguladoras de los genes de esta isla (Collazo & Galán, 1997; Pfeiffer *et al.*, 2007).

La maquinaria del T3SS capacita a célula bacteriana para el proceso de invasión de células eucariotas, formando una estructura compleja en forma de aguja, anclada entre las membranas interna y externa de la célula bacteriana (Kubori *et al.*, 1998). Esta estructura, cuando entra en contacto con células eucariotas, es capaz de inyectar

proteínas secretadas efectoras dentro de las mismas. Entre otros efectos, estas proteínas son capaces de alterar la estructura del citoesqueleto, promoviendo la reorganización de los filamentos de actina e induciendo el proceso fagocitario de la célula bacteriana (Galán, 2001; Zhou & Galán, 2001).

Los genes estructurales y las proteínas de la SPI1 están codificados en tres operones: *prg/org*, *inv/spa* y *sic/sip*, (Fig. 1.15). Los operones *prg/org* y *inv/spa* codifican para la estructura inyectora *per se*, y el operon *sic/sip* codifica proteínas efectoras (Lostroh & Lee, 2001).

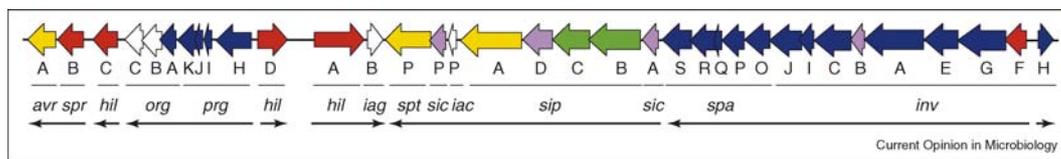


Figura. 1.15. Representación esquemática de la SPI1. Organización genómica de los genes constituyentes del sistema de secreción del tipo III y proteínas efectoras codificados por SPI1. Cada uno de los colores representa una clase de genes. Los que codifican la estructura inyectora están marcados en azul, las translocasas en verde, los efectores en amarillo, las chaperonas en lila y los genes reguladores en rojo. En blanco se indican genes con función desconocida. Los nombres de los genes están indicados por la inicial mayúscula (e.j. F representa *invF*). Las flechas encontradas debajo de los nombres de los genes indican el transcrito formado. Adaptado de (Ellermeier & Slauch, 2007).

Además de los componentes estructurales y de las proteínas efectoras codificadas por la SPI1, varias proteínas reguladoras también están codificadas en esta isla (Altier, 2005), (Fig. 1.15).

1.7.2.1 Regulación de la SPI1 – el regulador transcripcional HilA

El regulador central de la SPI1 es la proteína HilA. El gen *hilA* fue inicialmente identificado en mutantes que presentaban un aumento en la capacidad de invadir células HEP-2 (Lee *et al.*, 1992). Su producto génico, la proteína HilA (*Hiperinvasion Locus A*) es un activador transcripcional perteneciente a familia OmpR/ToxR (Bajaj *et al.*, 1995). Posee un dominio de unión al ADN y un dominio en el extremo carboxi-terminal cuya función predicha es la de interacción con proteínas (Altier, 2005; Ellermeier & Slauch,

2007). En condiciones favorables para la célula en el proceso invasivo, como alta osmolaridad y fase estacionaria (Song *et al.*, 2004), HilA se une directamente a los promotores *prg/org* y *inv/spa* activando su transcripción, lo que provoca en cascada la expresión del operon *sic/sip* por la proteína InvF codificada en el operon *inv/spa* (Bajaj *et al.*, 1995; Ellermeier & Slauch, 2007; Lee *et al.*, 1992; Lostroh & Lee, 2001).

La expresión de la SPI1 es fuertemente dependiente de factores ambientales, lo que también sucede con la expresión del regulador central HilA. Ello sugiere que los niveles de expresión de la SPI1 son directamente dependientes de los niveles de HilA (Ellermeier & Slauch, 2007). Ensayos de invasión utilizando mutantes en *hilA* en ratones BALB/c mostraron que la delección de este gen genera un fenotipo equivalente a delección de SPI1 por completo (Ellermeier *et al.*, 2005).

La red de regulación que controla la expresión de *hilA* es extraordinariamente compleja y requiere las acciones combinadas de varios activadores y represores transcripcionales (Fig. 1.16). Los activadores HilC, HilD y RtsA tienen como diana el gen *hilA*. Pertenecen a familia de reguladores transcripcionales AraC-like (Ellermeier & Slauch, 2003; Olekhovich & Kadner, 2002; Schechter & Lee, 2001) y presentan un elevado nivel de homología en la región C-terminal (Ellermeier & Slauch, 2003). Los genes que codifican para las proteínas HilC y HilD están localizados en la SPI1, (Fig. 1.15), mientras que el gen que codifica RtsA se localiza en una región de 15kb localizada próxima al gen para ARNt *pheU* (Ellermeier & Slauch, 2003).

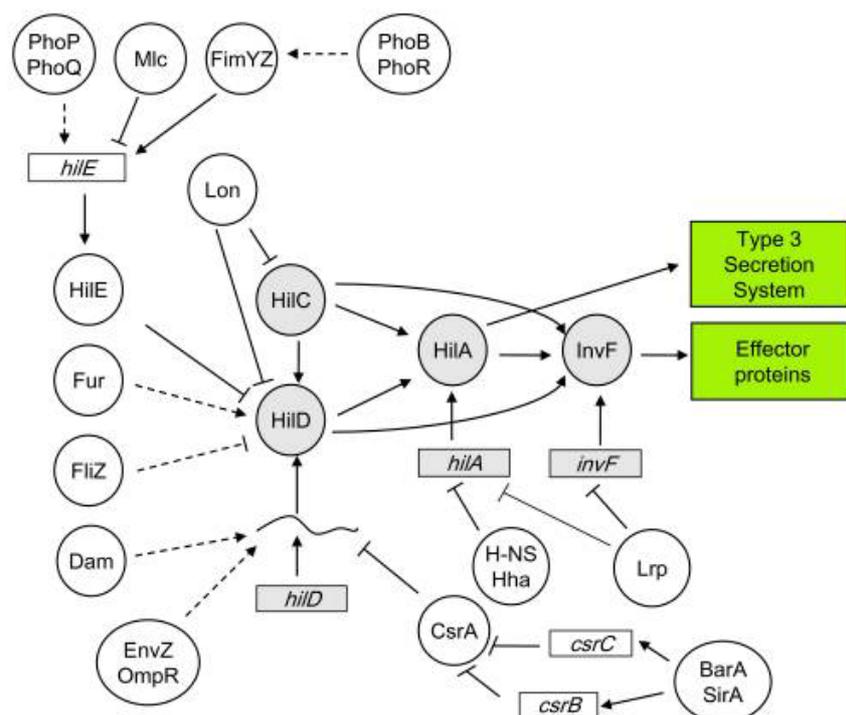


Figura. 1.16. Esquema de regulación de SPI1. Las cajas representan genes y los círculos proteínas. Las cajas y círculos presentados en gris indican reguladores codificados por SPI1. Las cajas y círculos en blanco representan reguladores codificados fuera de la SPI1. Las líneas terminadas en flechas representan inducción y las terminadas en barra representan represión. Adaptado de (López-Garrido & Casadesús, 2012).

Estos tres reguladores pueden unirse individualmente al promotor de *hilA*, activando su transcripción (Ellermeier *et al.*, 2005; Ellermeier & Slauch, 2003; Schechter & Lee, 2001). La sobreexpresión de HilC, HilD y RtsA induce la transcripción de sus promotores lo que, a su vez, lleva a un aumento en la expresión de *hilA* (Ellermeier *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que HilD está involucrado en coordinar la expresión de las SPI1 y SPI2 de *Salmonella* (Bustamante *et al.*, 2008). Pudo evidenciarse que HilD activa la expresión de ambas islas a tiempos distintos en fase estacionaria de cultivos bacterianos cuando fueron crecidos en LB (Bustamante *et al.*, 2008).

Los mecanismos reguladores ejercidos por estas tres proteínas en la activación de *hilA* están a su vez relacionados con la co-represión que ejercen las proteínas asociadas al nucleoide H-NS y Hha (Olekhovich & Kadner, 2006; Schechter *et al.*, 2003).

1.7.2.2 Otros reguladores de la SPI1

Adicionalmente a los reguladores previamente descritos, la expresión de los genes de la SPI1 depende de una compleja red donde intervienen distintos activadores y represores transcripcionales e influencia ambiental (Ellermeier & Slauch, 2007).

- Activadores de la SPI1:

La alarmona guanosina tetrafosfato (ppGpp) es una molécula efectora de bajo peso molecular que se acumula a altos niveles durante el estrés nutricional. La respuesta estricta es el proceso por el que las bacterias, detectando alteraciones nutricionales, se adaptan a esta situación incrementando los niveles de ppGpp (Pizarro-Cerdá & Tedin, 2004). En *E. coli* y *S. Typhimurium* la síntesis de ppGpp se lleva a cabo por los productos de los genes *relA* y *spoT* (Pizarro-Cerdá & Tedin, 2004). Mutantes de *Salmonella* para los genes *relA/spoT* son deficientes para la síntesis de la alarmona ppGpp, y adicionalmente están atenuados en la virulencia *in vivo* y son no invasivos *in vitro* (Pizarro-Cerdá & Tedin, 2004; Song *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006). La dependencia de ppGpp en la expresión de los activadores de la SPI1, *hilCDA* y *rtsA* y, consecuentemente, la correcta expresión de las islas 1 y 2 de *Salmonella* (SPI1 y 2), ha sido descrita recientemente (Thompson *et al.*, 2006).

El sistema regulador de dos componentes EnvZ/OmpR fue inicialmente caracterizado por su papel controlando la expresión de los genes *ompC/ompF*, que codifican para las porinas OmpC y OmpF en *E. coli*. De esta forma, la composición de porinas se adapta a la osmolaridad del medio (Pratt *et al.*, 1996). Posteriores estudios sugirieron que OmpR también controla genes asociados a virulencia (Ellermeier & Slauch, 2007). En el caso de la SPI1, OmpR controlaría su expresión regulando la transcripción de *hilD* (Fig. 1.16) (Ellermeier *et al.*, 2005).

Otro sistema regulador de dos componentes integrado en la regulación de la SPI1 es el sistema BarA/SirA. El sistema participa en la regulación de numerosos genes del metabolismo de carbohidratos, motilidad, formación de biofilms e invasión (Ahmer *et al.*, 1999). Trabajos recientes sugieren una acción inductora de SirA sobre el promotor de *hilD*, desencadenando la expresión de HilA (Ellermeier *et al.*, 2005). Aparte de otros estímulos, BarA/SirA parecen responder a presencia de bilis (Prouty & Gunn, 2000). SirA puede estar actuando induciendo la expresión de dos pequeños

ARNs (*sRNA*) *csrB* y *csrC*, y estos actuando como antagonistas a otro ARNs, *csrA*. La unión de *csrA* al ARNm de *hilD* impediría su traducción o promovería su degradación. Así, la inducción mediada de SirA sobre *csrC* interferiría con la acción de *csrA*, activando indirectamente la expresión pos-traducional de *hilD* (Fortune *et al.*, 2006).

Fur (*Ferric Uptake Regulator*) es considerado el mayor regulador en respuesta a carencia de hierro en *Salmonella*, y recientemente ha sido incluido en la red regulatoria de la SPI1 (Ellermeier & Slauch, 2007). Mutantes *fur* poseen bajos niveles de *hilA* y, además, su sobreexpresión aumenta los niveles de *hilA*, sugiriendo un efecto indirecto sobre este gen (Ellermeier & Slauch, 2008). Estudios realizados apuntan que este efecto es mediado por HilD. Fur controlaría post-transcripcionalmente el ARNm *hilD* por la acción de un intermediario no caracterizado (Ellermeier & Slauch, 2008). Fur induce predominantemente el sistema en condiciones de baja concentración de oxígeno (Ellermeier & Slauch, 2008). A título de ejemplo en *E. coli*, el gen *sodB* es regulado por Fur a nivel traduccional por la acción en conjunto de Hfq y un ARN pequeño no codificante *ryhB* (Geissmann & Touati, 2004; Massé *et al.*, 2005; Vecerek *et al.*, 2003).

El regulador global Mlc, represor de varios genes involucrados en absorción y metabolismo de carbohidratos en *S. Typhimurium* ejercería un efecto positivo en la expresión de SPI1 por reducir la expresión de HilE (Lim *et al.*, 2007).

Recientemente se ha caracterizado un nuevo gen en la SPI1, el gen *invR*, que codifica para un abundante ARNs en *S. Typhimurium* (Pfeiffer *et al.*, 2007). *invR* es activado por HilD bajo condiciones que favorecen la invasión. Datos genéticos sugieren la interacción de *invR* con la chaperona Hfq, manteniendo así su estabilidad. El complejo Hfq-*invR* actuaría silenciando el ARNm de *ompD* y regulando así los niveles de la porina *ompD* (Pfeiffer *et al.*, 2007). Asimismo Hfq parece ser requerido para un nivel elevado de expresión de HilA (Pfeiffer *et al.*, 2007; Sittka *et al.*, 2007).

La enzima Dam (*DNA adenine methylase*) también ejerce un efecto regulador en la expresión de SPI1. Mutantes para este enzima presentan bajos niveles de expresión de los activadores HilC, HilD, HilA y InvF (López-Garrido & Casadesús, 2010). No obstante parece ser que el efecto regulador dado por la proteína Dam sería a nivel postranscripcional, afectando la estabilidad del ARNm de *hilD* (López-Garrido & Casadesús, 2010).

- Represores de la SPI1:

HilE es considerado un importante represor de la SPI1. Mutantes en *hilE* poseen aumentados los niveles de *hilA* únicamente en presencia de *hilD* (Baxter *et al.*, 2003). Aunque el mecanismo exacto de acción de HilE aun no está claro, datos de interacción proteína-proteína mediante el sistema de doble híbrido sugieren la unión de HilE directamente a HilD, evitando la activación de *hilA* (Baxter *et al.*, 2003). A su vez, *hilE* está regulado por varios sistemas capaces de interferir con la expresión de la SPI1 (Ellermeier & Slauch, 2007).

Los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PhoR/PhoB actúan regulando negativamente la expresión de la SPI1. PhoP/PhoQ actúa en respuesta a bajas concentraciones de Mg^{2+} y bajo pH, mientras que PhoR/PhoB responden a bajas concentraciones de fosfato inorgánico (Lucas *et al.*, 2000; Monsieurs *et al.*, 2005). PhoP actúa probablemente a través de la inducción directa de *hilE* (Baxter & Jones, 2005) y PhoR/PhoB regulando la transcripción de *fimZY* (Jones, 2005). Las proteínas FimZ y FimY son reguladores de los genes que codifican para la fimbria de tipo I (Yeh *et al.*, 2002), y controlarían a expresión de la SPI1 regulando la transcripción de *hilE* (Baxter & Jones, 2005).

1.7.3. Isla de patogenicidad de *Salmonella* 2 – SPI2

La isla de patogenicidad 2 de *Salmonella*, SPI2, se localiza en los centisomas 30 y 31 del cromosoma de *Salmonella*, posee un tamaño de 40 kb, y se localiza adyacente al gen ARNt *valV*, (Fig. 1.17). Las funciones realizadas por los productos génicos de esta isla son esenciales para la patogénesis de *Salmonella*. Posibilitan la supervivencia de la célula bacteriana en los fagosomas de los macrófagos (*Salmonella-containing vacuole* – SCV), y también permiten el desarrollo de la infección sistémica y la proliferación a diferentes órganos del hospedador (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Valdivia & Falkow, 1997). Genómicamente, la SPI2 esta formada por dos elementos distintos. El primero corresponde a una región de 25 kb presente solamente en *Salmonella enterica* y que es esencial para la diseminación sistémica, e incluye los genes que codifican para un segundo sistema de secreción del tipo 3 (T3SS-2). La segunda región de 15 kb se ha detectado en *S. enterica* y *S. bongori*. Esta segunda región no es necesaria para la patogénesis y posee, entre otros, el operón *ttrBCA*, el cual

codifica para la tetrathionina reductasa, implicada en la respiración anaeróbica, y el operón *ttrRS*, que codifica el sistema regulador de los genes *ttr* (Hansen-Wester & Hensel, 2001; Kuhle & Hensel, 2004).

El segundo sistema de secreción del tipo 3 (T3SS-2) codificado por la SPI2 permite que *Salmonella* sobreviva y replique en el interior de los macrófagos en las infecciones sistémicas. Las condiciones ambientales que desencadenan la inducción de los genes presentes en este sistema son la falta de nutrientes, principalmente magnesio, calcio y fosfatos (Hensel, 2000; Hensel *et al.*, 1998; Kuhle & Hensel, 2004). El T3SS-2 está codificado por 31 genes, organizados en dos operones: en el primero se codifican los genes de la maquinaria de secreción, *ssa* (*secretion system apparatus*), una unidad transcripcional que codifica para proteínas efectoras, *sse* (*secretion system effectors*) y diferentes chaperonas, *ssc* (*secretion system chaperonas*). En el segundo operón se codifica el sistema de regulación de dos componentes SsrAB (*secretion system regulator A, B*) (Kuhle & Hensel, 2004).

SsrB es la proteína reguladora y SsrA (también conocida por SpiR) es la proteína integral de membrana. La proteína SsrB se une a los promotores de todos los genes pertenecientes a SPI2, desencadenando la correcta expresión de la maquinaria de secreción del tipo III y proteínas efectoras (Walthers *et al.*, 2007; Worley *et al.*, 2000). La proteína SsrB se une y regula la transcripción del gen *ssrA* y también es capaz de autoregular su transcripción (Feng *et al.*, 2003) (Fig. 1.18). La proteína SsrA posee dos dominios transmembrana, los cuales definen una amplia región periplasmática involucrada en detectar señales que hasta el momento no se conocen (Fass & Groisman, 2009).

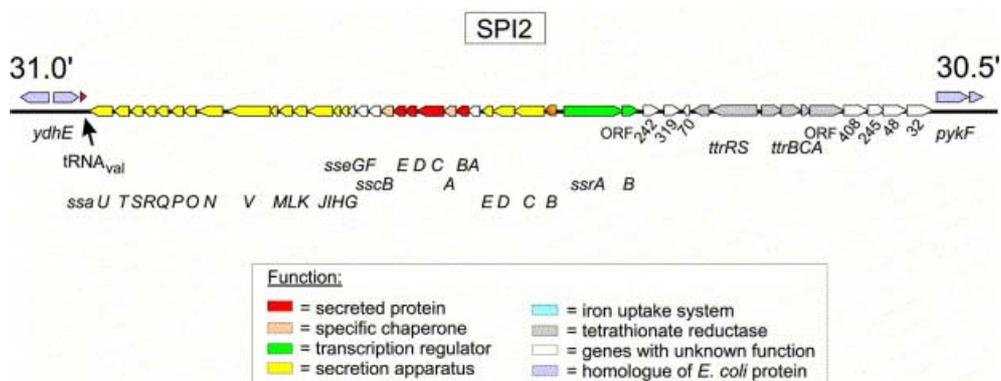


Figura. 1.17. Representación esquemática de la SPI2. Adaptado de (Hansen-Wester & Hensel, 2001).

1.7.3.1 Regulación de la SPI2

La SPI2, al igual que otros genes adquiridos horizontalmente, posee un elevado porcentaje de A y T (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). Se sabe que la proteína H-NS reprime la expresión de los genes asociados a SPI2 (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; 2007). Parece ser que H-NS se une directamente al promotor del gen *ssrA* o *spiR* (Bustamante *et al.*, 2008). No obstante, parece haber un efecto de *cross-talk* entre la isla 1 y 2 de *Salmonella*, debido a que la proteína HILD, codificada en la SPI1, estaría actuando en determinadas condiciones como un agente antagonista en la represión mediada por H-NS en el promotor de *ssrA* (Bustamante *et al.*, 2008), (Fig. 1.18).

Las proteínas Hha e YdgT también contribuyen en la represión de la expresión de la SPI2 (Coombes *et al.*, 2005). Como se ha comentado anteriormente, la proteína YdgT es una paróloga de la proteína Hha y se ha descrito que estas proteínas interaccionan con la proteína H-NS. YdgT en este caso, parece estar actuando en conjunto con H-NS en la represión del gen *ssrB*. Los complejos formados por YdgT/H-NS actuarían reprimiendo la transcripción de *ssrB*. A su vez, la proteína SsrB es capaz de antagonizar el efecto represor de YdgT/H-NS. Se ha propuesto un sistema *on/off*, el cual previene la formación de proteínas truncadas de la SPI2 en el proceso infeccioso (Coombes *et al.*, 2005). Hha también parece estar involucrada en la represión del gen *ssrB*. Hha estaría actuando en conjunto con H-NS cuando las células bacterianas no se encuentran en el ambiente intracelular (Silphaduang *et al.*, 2007).

Las proteínas IHF y Fis también parecen contribuir en la expresión de los genes de la SPI2. IHF posee papeles cruciales en la activación de los reguladores en la SPI1 y SPI2 (Mangan *et al.*, 2006). Se ha puesto de manifiesto que la proteína Fis es capaz de unirse a los promotores de los genes *spiR* y *ssaG*, codificados en la SPI2 (Kelly *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006), desencadenando la expresión del sistema. Fis parece ser más indispensable cuando las células se encuentran intracelularmente. La razón de ello sería que la expresión de la SPI2 depende de la correcta topología del ADN, la cual estaría influenciada por Fis (O Cróinín *et al.*, 2006).

Los sistemas de dos componentes OmpR/EnvZ y PhoP/PhoQ también ejercen papeles cruciales en la correcta expresión de los genes asociados a SPI2. El regulador OmpR se une al promotor del gen *spiR* (Lee *et al.*, 2000) y también del gen *ssrB* (Feng *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000), desencadenando la expresión del activador transcripcional SpiR/SsrB. El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ es crucial para el proceso de

virulencia en *Salmonella* (Groisman, 2001). Este sistema controla varios determinantes de virulencia como *mgtC* (Blanc-Potard & Groisman, 1997), *mig-14* (Brodsky *et al.*, 2002), y *macAB* (Nishino *et al.*, 2006). En la expresión de la SPI2, PhoP/PhoQ poseen papeles esenciales en la supervivencia dentro de macrófagos (Miller *et al.*, 1989), y PhoP activa los reguladores de la SPI2 cuando *Salmonella* se encuentra dentro del hospedador (Heithoff *et al.*, 1999; Mouslim & Groisman, 2003; Valdivia & Falkow, 1997).

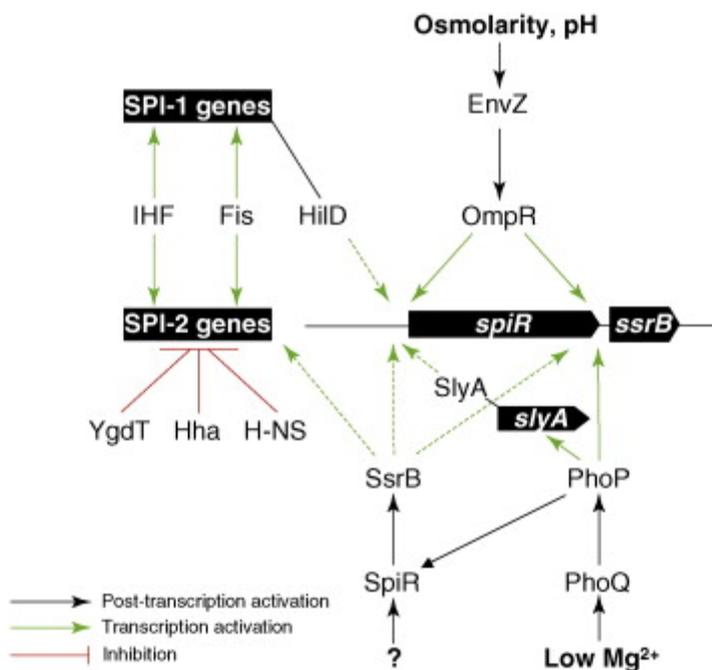


Figura. 1.18. Representación esquemática de la regulación de SPI2. Las flechas en negro representan activación post-transcripcional, las flechas en verde representan activación transcripcional, y las barras en rojo representan represión. En esta figura se presenta la regulación cruzada de HilD sobre las islas 1 y 2 (Bustamante *et al.*, 2008). Adaptado de (Fass & Groisman, 2009).

1.8. *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVO (EAEC)

El patotipo enteroagregativo de *Escherichia coli* fue primeramente descrito en 1985 debido a la capacidad de este patógeno en adherirse a células HEp-2 de forma agregativa, lo que es conocido como patrón de “apilado de ladrillos”, del inglés *stacked brick-like pattern* (Nataro *et al.*, 1987). Este patrón de adherencia, distinguible de todos los otros patotipos de *E. coli* como, por ejemplo, de EPEC (*enteropathogenic E. coli*) y DAEC (*diffusely adherent E. coli*), fue primeramente asociado con cuadros de diarreas en niños en Santiago, Chile en 1987 (Nataro *et al.*, 1987). Este patotipo de *E. coli* es definido por su fenotipo de adherencia agregativa (AA) observado cuando se adhiere a la superficie celular como, por ejemplo, en cultivos de células HEp-2 (Nataro *et al.*, 1987). Estudios realizados revelaron que este fenotipo de adherencia agregativo está

asociado a presencia de un plásmido de 55-65 MDa de tamaño llamado pAA (Vial *et al.*, 1988). Sondas de ADN específicas para este plásmido, llamadas sondas AA, fueron utilizadas para distinguir cepas EAEC de otras cepas de *E. coli* (Baudry *et al.*, 1990). Varios estudios epidemiológicos utilizan el fenotipo y sondas AA para identificar el patotipo EAEC (Germani *et al.*, 1998; Huppertz *et al.*, 1997; Okeke *et al.*, 2003). Aunque esta sonda (AA) apenas identifica una parte de las cepas que exhiben el fenotipo de adherencia agregativo, estudios epidemiológicos sugieren que las mismas representan el verdadero patotipo EAEC (Harrington *et al.*, 2006). Por tanto, la presencia del plásmido pAA es excluyente para este patógeno.

Los aislamientos clínicos del patotipo enteroagregativo de *E. coli* presentan resistencia múltiple a antibióticos (Yamamoto *et al.*, 1992). Estudios epidemiológicos con este patógeno describieron un alto índice de aislados multiresistentes a antibióticos como, por ejemplo, tetraciclina, espectinomicina, estreptomycin, cloranfenicol y ampicilina (Sang *et al.*, 1997; Vila *et al.*, 1999; 2001). Actualmente se sabe que la multiresistencia de este patógeno es debida a la presencia de un transposón, Tn2411 (Tn21-like) (Fig. 1.19), insertado en el cromosoma de esta especie. Tn2411 posee genes los cuales codifican para la resistencia a cloranfenicol, tetraciclina y, además, posee un integrón de clase I (*In2*) el cual codifica para las resistencia a estreptomycin y espectinomicina, sulfonamidas y bromuro de etidio (Chaudhuri *et al.*, 2010).

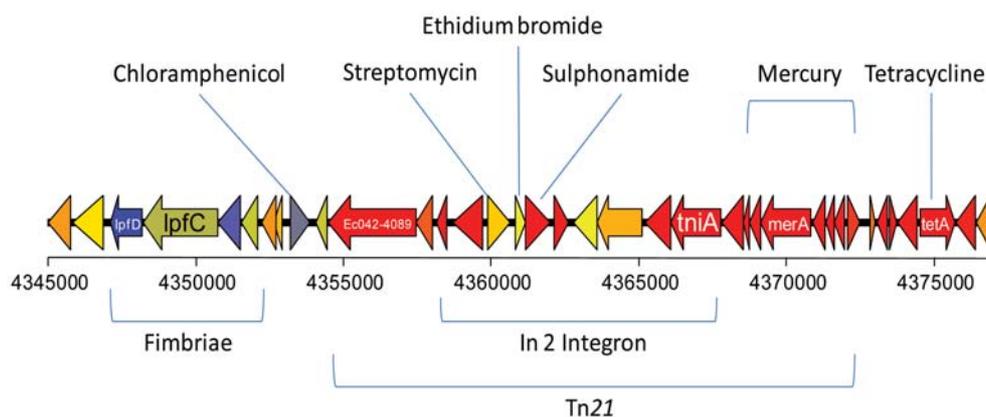


Figura. 1.19. Organización genética del transposón Tn21 y sus respectivos genes codificantes para multiresistencia a antibióticos. El transposón Tn21 está insertado entre los genes *lpfA* y *glmS*. Adaptado de (Chaudhuri *et al.*, 2010).

1.8.1. Factores de virulencia encontrados en EAEC

Recientemente el genoma de la cepa prototipo de EAEC, *E. coli* 042, fue secuenciado (Chaudhuri *et al.*, 2010). El genoma presenta un total de 4.886 genes. Un 11% son proteínas hipotéticas conservadas pero sin función atribuida y un 10% parecen ser elementos móviles tales como integrasas, transposasas, o relacionados a bacteriófagos (Chaudhuri *et al.*, 2010). Sorprendentemente se identificaron 78 islas genómicas en este patotipo las cuales están distribuidas de forma variable entre los genomas de *E. coli* secuenciados hasta la fecha (Chaudhuri *et al.*, 2010), divergiendo también en secuencia. Estas islas genómicas son designadas ROD “*regions of difference*” y poseen en conjunto un tamaño de 1.26Mb, lo cual representa el 24% del cromosoma (Chaudhuri *et al.*, 2010). Las RODs codifican genes de virulencia, proteínas metabólicas, proteínas sin función atribuida y elementos móviles como profagos y un transposón conjugativo, Tn2411 (Chaudhuri *et al.*, 2010).

El prototipo de EAEC *E. coli* 042 posee un plásmido de aproximadamente 113,346 pb (Chaudhuri *et al.*, 2010). Este plásmido, denominado pAA2 en el prototipo 042, pertenece a familia IncFIIA (Czeczulin *et al.*, 1997). Posee 152 pautas abiertas de lectura, de las cuales 32 son pseudogenes. Del total de genes, 7 son proteínas hipotéticas sin homología en la base de datos, 23 codifican proteínas conservadas sin función atribuida, y 55 codifican proteínas involucradas en transferencia, replicación y mantenimiento del plásmido. Existen 18 genes con función atribuida a elementos móviles como transposasas y los 17 genes restantes poseen función o se supone están involucrados en virulencia (Chaudhuri *et al.*, 2010) (Fig. 1.20)

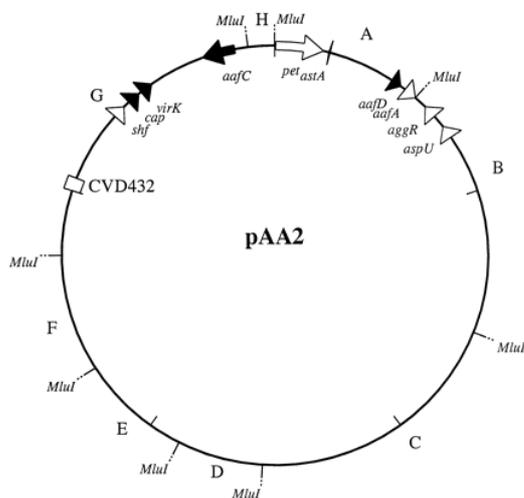


Figura. 1.20. Mapa representativo del plásmido pAA2 del prototipo de *E. coli* 042. Adaptado de (Czeczulin *et al.*, 1999).

1.8.1.1 Toxinas

El plásmido pAA2 codifica para dos toxinas, la toxina Pet (*plasmid-encoded toxin*), y EAST-1 (gen *astA*), (Fig. 1.20). La proteína Pet es una proteasa perteneciente a familia de serín proteasas (*serine protease autotransporter* – SPATE) secretada por la cepa 042 (Eslava *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1999b). Una vez secretada, Pet parece ser internalizada por las células del hospedador y promover la degradación de las proteínas del citoesqueleto (Navarro-García *et al.*, 2001; Villaseca *et al.*, 2000). La regulación de la expresión de esta toxina es poco conocida. Solamente se ha caracterizado que la expresión de la misma es dependiente de las proteínas CRP (*cyclic AMP receptor protein*) y Fis, y que ambas ejercen un efecto sinérgico en el promotor del gen *pet* (Rossiter *et al.*, 2011).

La proteína EAST-1 es codificada por el gen *astA* y se localiza adyacente al gen *pet* en el plásmido pAA2. Esta toxina está ampliamente distribuida en distintas cepas y diferentes patovares (Czeczulin *et al.*, 1999). EAST-1 promueve el aumento en la secreción de aniones (Ménard *et al.*, 2004; Savarino *et al.*, 1993). El hecho de que esta proteína también esté presente en la cepa enteroagregativa 17-1, la cual no promueve diarreas en voluntarios, sugiere que la función de EAST-1 no es únicamente provocar diarreas (Ménard *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 1995).

El patotipo de *E. coli* 042 también posee dos toxinas codificadas en el cromosoma, las proteínas ShET1 y HlyE. La proteína HlyE posee una masa molecular de 34 kDa, es capaz de oligomerizar en estructuras complejas formando un poro en la superficies celular, lo cual se ha comprobado que genera efectos citolíticos y citopáticos en células humanas *in vitro* (Mueller *et al.*, 2009). El hecho de que esta toxina esté presente en especies de bacterias no patógenas, sugiere que la misma posee papeles secundarios en la patogénesis (Rhein *et al.*, 2008).

La proteína ShET1 está compuesta por dos subunidades codificadas por los genes *setA* y *setB*. Una subunidad de la proteína SetA se asocia con un pentámero de la proteínas SetB, y juntas forman un oligómero de 20kDa (Henderson *et al.*, 1999a). La toxina ShET1 parece promover la secreción intestinal via cAMP y cGMP, aunque el mecanismo bioquímico de este proceso continua desconocido (Henderson *et al.*, 1999a).

1.8.1.2 Fimbrias y adhesinas

La secuenciación del genoma de *E. coli* 042 reveló la sorprendente plasticidad de este patógeno en la adaptación y supervivencia en distintos nichos ecológicos. La cepa 042 posee 11 familias diferentes de fimbrias (Chaudhuri *et al.*, 2010), de las cuales solamente una clase se encuentra codificada en el plásmido de virulencia pAA2, mientras que todas las restantes están codificadas en el cromosoma. Estudios filogenéticos encontraron diferencias significativas en la distribución de las distintas familias de fimbrias en *E. coli* relacionadas (Fig. 1.21). No se sabe exactamente por qué el patotipo 042 presenta esta gran variedad de fimbrias, pero una posible explicación sería el reflejo de la adaptación en colonizar diferentes hospedadores así como distintos nichos en el mismo hospedador (Humphries *et al.*, 2005).

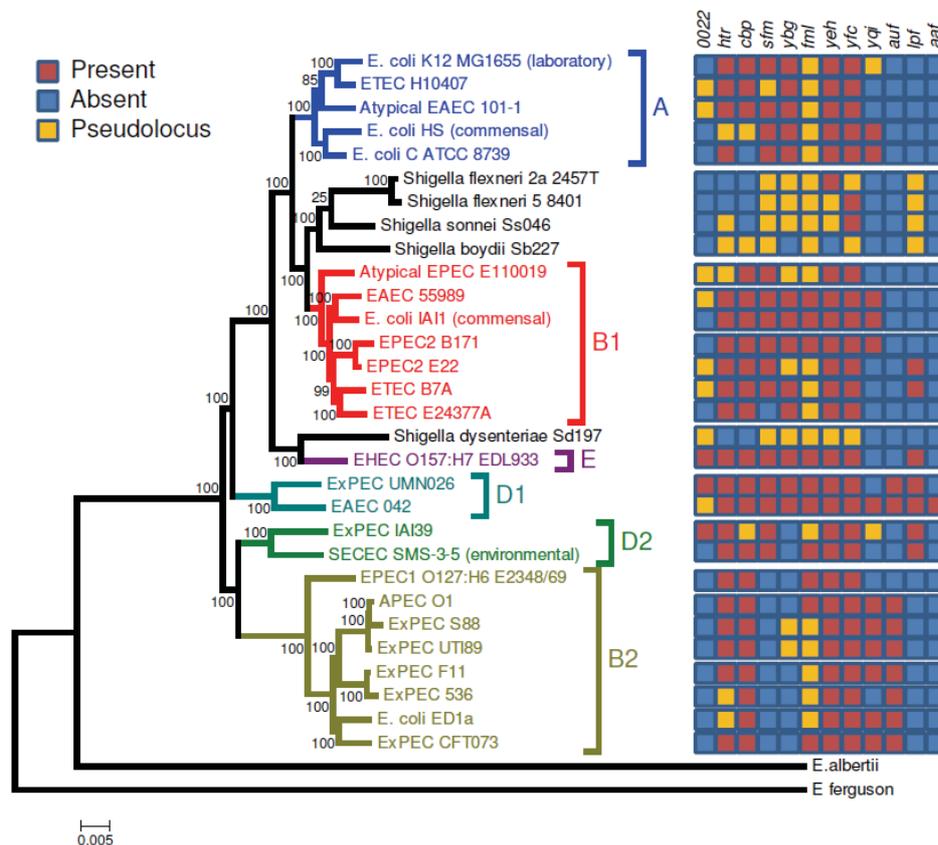


Figura. 1.21. Distribución filogenética de los distintos *loci* de fimbrias distribuidos entre estirpes patógenas y no patógenas de *E. coli*. En el lado izquierdo de la figura se presentan las relaciones filogenéticas existentes entre los distintos patotipos de *E. coli*. Al lado derecho se muestra la distribución de las distintas familias de fimbrias relacionadas a los patotipos de *E. coli*. Los colores hacen referencia a presencia de la familia de fimbrias (rojo), ausencia de las mismas (azul), o pseudogenes (amarillo). Nótese que el patotipo 042 se encuentra en el grupo D1. Adaptado de (Chaudhuri *et al.*, 2010).

De todas las familias de fimbrias encontradas en la cepa 042, la mejor estudiada es la familia de fimbrias agregativas adherentes relacionadas a familia Dr, AAF/II (*aggregative adherence fimbria/II*) (Czeczulin *et al.*, 1997). La biogénesis de las adhesinas AAF presenta una organización similar a la de las adhesinas de la familia Dr encontradas en *E. coli* uropatogénicas (UPEC) y difusivo adherentes (DEAC) (Harrington *et al.*, 2006). El fenotipo de adherencia agregativo (AA) es mediado por estas fimbrias agregativas, lo cual se comprueba expresando estas fimbrias en *trans* en *E. coli* K12, lo que le confiere el fenotipo AA (Nataro *et al.*, 1992). Existen tres variantes alélicas de estas fimbrias adherentes, AAF/I, AAF/II y AAF/III (Bernier *et al.*, 2002; Czeczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1992). En el patotipo 042 está presente la variante AAF/II. Los genes requeridos para biogénesis de estas fimbrias adherentes se codifican en el plásmido de virulencia pAA2 en dos operones distintos (*aafDA* y *aafCB*). La mayor subunidad de estas fimbrias, la proteína AafA presenta menos de 25% de homología en la secuencia aminoacídica con la variante AggA (AAF/I) (Czeczulin *et al.*, 1997). La subunidad AafA parece ser indispensable para la formación de biofilms e interacción con células eucariotas (Czeczulin *et al.*, 1997), mientras que la subunidad AafB ha sido implicada en la invasión de células epiteliales (Jouve *et al.*, 1997). Curiosamente existen aislamientos clínicos de EAEC que presentan el fenotipo AA, pero no presentan ninguna de las variantes AAF. Estos datos sugieren la presencia de adhesinas adicionales aún no caracterizadas (Bernier *et al.*, 2002; Czeczulin *et al.*, 1997; Harrington *et al.*, 2006). La expresión de los genes *aaf* requiere el activador transcripcional AggR (Nataro *et al.*, 1994). La proteína AggR codificada en el plásmido pAA2, pertenece a familia de activadores transcripcionales AraC (Nataro *et al.*, 1994), y está involucrada en la activación de varios genes de virulencia como, por ejemplo, los genes AAF (*aafDA*), la dispersina (*aap*), el sistema de transporte de la dispersina (*aatPABCD*), y el sistema de secreción del tipo VI (*aaiA-Y*) (revisado por Morin *et al.*, 2010). La proteína AggR posee dominios de unión al ADN, es capaz de unirse a los promotores de los genes activados por la misma y, no obstante, es capaz de regular su propia expresión (Morin *et al.*, 2010). La regulación de este activador transcripcional todavía es poco conocida, pero se sabe que la proteína Fis afecta a la correcta expresión del mismo (Sheikh *et al.*, 2001), y que la proteína H-NS es capaz de reprimir su transcripción (Morin *et al.*, 2010).

1.8.1.3. Sistemas de secreción del tipo I y II encontrados en *E. coli* 042

El genoma de la cepa de *E. coli* 042 presenta los genes codificantes para los sistemas de secreción del tipo I al VI (Chaudhuri *et al.*, 2010). No obstante, en algunos casos presenta más de una copia para determinados sistemas, como es el caso del sistema de secreción del tipo I (T1SS). En bacterias gram-negativas el sistema de secreción del tipo I está compuesto por tres subunidades, siendo la primera una proteína del tipo TolC (*outer membrane pore-forming protein* – OMP), y las otras dos subunidades son proteínas localizadas en la membrana interna, una proteína fusionada a membrana (*membrane-fusion protein* – MFP), la cual entra en contacto con la proteína tipo TolC, y la segunda, una proteína tipo ABC que se une a ATP y es capaz de transducir energía para el funcionamiento del sistema (Henderson *et al.*, 2004). Tal y como ha sido comentado anteriormente, la cepa *E. coli* 042 posee tres T1SS: una copia codificada en el locus *aat* del plásmido pAA2 y dos copias codificadas en el cromosoma (Sheikh *et al.*, 2002). El gen *aap* (*antiaggregation protein*, más conocida como dispersina, Aap) codificado en el plásmido pAA2, es una proteína secretada a la superficie celular por la maquinaria T1SS codificada por el mismo plásmido (genes *aatPABCD*) (Sheikh *et al.*, 2002). Cuando la proteína Aap es secretada a la superficie celular se une mediante enlaces no covalentes al LPS de la célula bacteriana (Sheikh *et al.*, 2002). Aap parece neutralizar la fuerte carga negativa del LPS, y así la AAF, la cual posee una fuerte carga positiva, puede extenderse desde la superficie bacteriana y unirse a distintos sustratos (Harrington *et al.*, 2006). No obstante, mutantes en el gen *aap* presentan un fenotipo de agregación celular y datos de estudios moleculares confirmaron que tal fenotipo es debido a un colapso de cargas entre AAF y el LPS celular debido a ausencia de la dispersina Aap (Sheikh *et al.*, 2002). La secreción de Aap tiene lugar a través del T1SS compuesto por los genes *aatPABCD*. AatD es la proteína fusionada a membrana (MFP), AatC y AatP transducen energía al sistema (ABC), y AatA es la porina tipo TolC (OMP). No obstante, este sistema posee un componente adicional sin función atribuida (AatB) (Sheikh *et al.*, 2002). Los otros dos T1SS parecen ser homólogos al encontrado en las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas, en las cuales los sustratos secretados son la toxina RTX (Chaudhuri *et al.*, 2010), y el factor microcina H47 (Rodríguez *et al.*, 1999).

La cepa de *E. coli* 042 posee todos los genes de la maquinaria del sistema de secreción del tipo 2 (T2SS) (Chaudhuri *et al.*, 2010). Parece ser que el locus donde se

codifican estos genes es transcrito aguas arriba del mismo, resultando en un ARNm policistrónico el cual codifica todos los componentes del T2SS (Yang *et al.*, 2007). Estudios genómicos entre distintas cepas de *E. coli* secuenciadas revelaron que los genes codificantes para este sistema están conservados en la mayoría de las cepas de *E. coli* patógenas (Chaudhuri *et al.*, 2010). En la cepa enterotoxigénica (ETEC) *E. coli* H104107 se evidenció que el T2SS es el responsable de secretar la enterotoxina “heat-labile” (LT) (Tauschek *et al.*, 2002), pero en el caso de la cepa 042 ésta no posee el *locus* para LT, lo que sugiere que este sistema secreta otros substratos aún no caracterizados (Chaudhuri *et al.*, 2010).

1.8.1.4 Sistemas de secreción del tipo III encontrados en *E. coli* 042

Determinadas cepas de *E. coli* utilizan el sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) para producir el sistema flagelar y/o para inyectar proteínas efectoras dentro de las células del hospedador (Pallen & Gophna, 2007). EAEC 042 posee los genes codificantes del flagelo, lo que le confiere el serotipo H18. 042 posee también un *locus* adicional que codifica para un segundo sistema de flagelo, Flag-2, también encontrado en cepas de *E. coli* relacionadas (Ren *et al.*, 2005). El genoma de 042, además de los T3SS descritos anteriormente, presenta dos *clusters* de T3SS no relacionados con la síntesis de flagelo. Estos dos sistemas se denominan ETT2 (*E. coli* T3SS 2) y *eip*, se localizan insertados próximamente a los ARNt *glyU* y *selC*, respectivamente (Chaudhuri *et al.*, 2010) y ambos presentan características de islas de patogenicidad (Ren *et al.*, 2004a). En *E. coli* 042 el sistema ETT2 parece ser un sistema activo debido a integridad del *locus* (Ren *et al.*, 2004a; Sheikh *et al.*, 2006) (Fig. 1.22).

La isla ETT2 fue inicialmente caracterizada en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, y en esta cepa parece no ser funcional debido a mutaciones acumuladas a lo largo de la evolución de esta especie (Ren *et al.*, 2004a) (Fig. 1.22).

La isla ETT2 posee genes ortólogos encontrados en las islas de patogenicidad 1, 2 y 3 de *Salmonella* (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001) (Fig. 1.22). Estos genes son los activadores transcripcionales encontrados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* SPI-1, la proteína HilA (YgeH en ETT2) y SPI-2, la proteína SsrB (YgeK en ETT2) (Ren *et al.*, 2004a). En la ETT2 también se encuentran homólogos de genes no caracterizados de la SPI-3 en *Salmonella*, como es el caso de *rmbA* (*yqeH* en ETT2), *marT* (*yqeI* en ETT2), y *fidL* (*yqeJ* en ETT2) (Ren *et al.*, 2004a).

La isla de patogenicidad *eip* posee 20,9 kb de tamaño (Ren *et al.*, 2004a). Esta isla posee dos homólogos de proteínas efectoras en *Salmonella*, las proteínas SipB (EipB en *eip*), y SipD (EipD en *eip*). No obstante, también posee homólogos para una chaperona encontrada en la SPI-1 de *Salmonella*, la proteína SicA (EicA en *eip*) y curiosamente, otro homólogo de la proteína HilA de *Salmonella* (EilA en *eip*) (Ren *et al.*, 2004a).

Estudios filogenéticos basados en la secuencia de las chaperonas de las islas ETT2 y *eip* de la cepa 042 sugieren que las mismas surgieron de una duplicación después de la divergencia de la isla ETT2 de la isla SPI-1 de *Salmonella* (Ren *et al.*, 2004a). Estos resultados sugieren que ambas islas, ETT2 y *eip*, formaron parte un día de una única isla de patogenicidad, y que la misma ha divergido del ancestro común en conjunto con la isla SPI-1 de *Salmonella* (Ren *et al.*, 2004a).

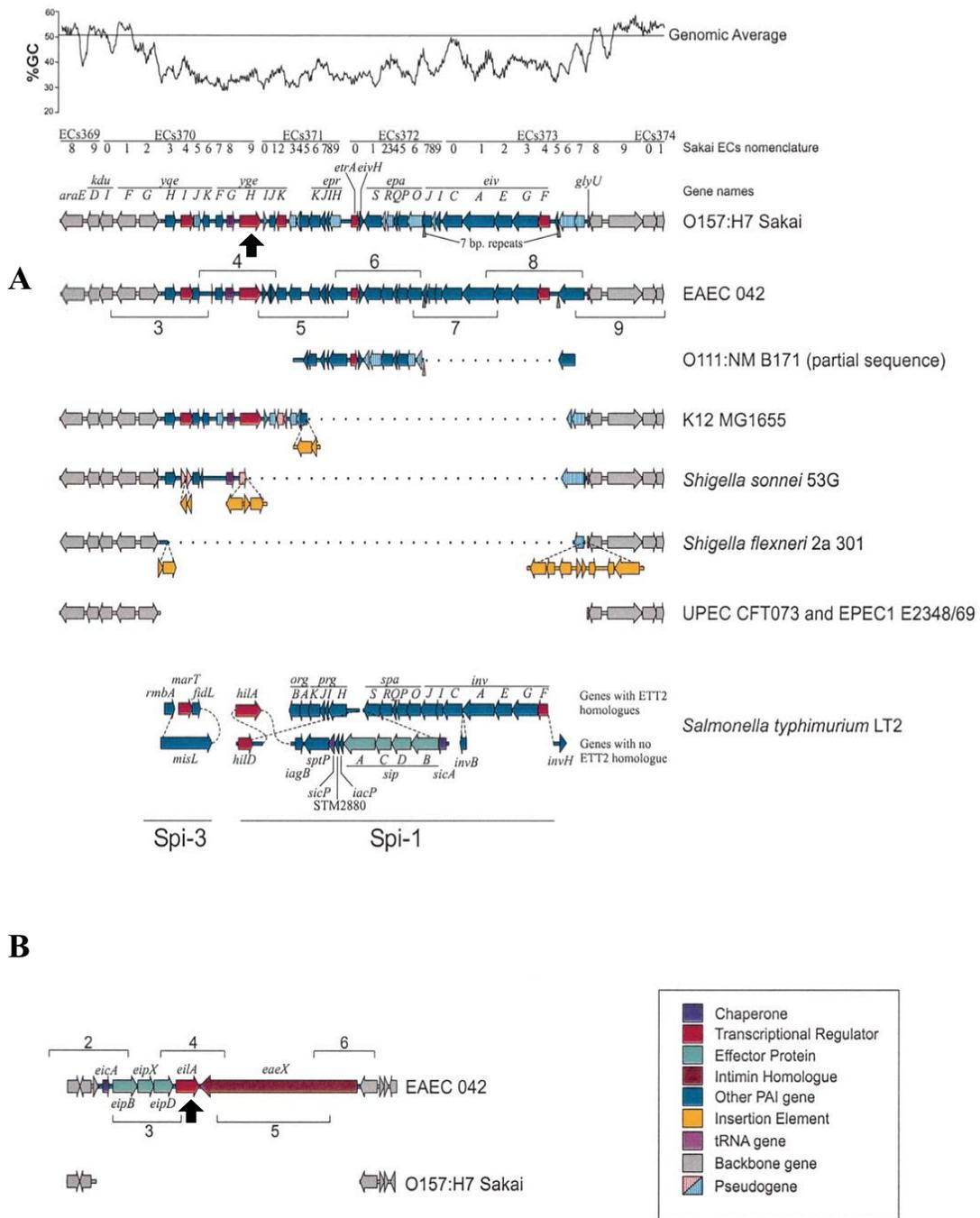


Figura. 1.22. Representación esquemática de las islas de patogenicidad ETT2 y *eip*. A) Estructura de la isla de patogenicidad ETT2 comparada entre varias cepas de *E. coli* y *Shigella*, y comparación con las regiones de las SPI-1 y SPI-3 de *S. Typhimurium*. Los genes homólogos están alineados verticalmente. Las inserciones ocurridas al largo de la escala evolutiva están representadas por las flechas en amarillo y las deleciones están representadas por líneas discontinuas. B) Estructura de la isla *eip* en la cepa 042. Los genes *ygeH* (A) y *eilA* (B) codifican para reguladores que presentan un elevado grado de similitud con *HilA*, se encuentran destacados por flechas en negro. Adaptado de (Ren *et al.*, 2004a).

1.8.2 Proteínas ortólogas a HilA de *Salmonella* encontradas en *E. coli* 042

La proteína EilA encontrada en la isla de patogenicidad *eip*, y la proteína YgeH encontrada en la isla ETT2 de la cepa 042 fueron caracterizadas como proteínas ortólogas a HilA de *Salmonella* (Ren *et al.*, 2004a) (ver Fig. 1.22). El papel de la proteína YgeH en la regulación de la isla ETT2 de la cepa 042 no se conoce. No obstante, el papel de la proteína EilA fue parcialmente clarificado en la regulación de la isla *eip*, y sorprendentemente en la isla ETT2. En la regulación de la isla *eip*, EilA parece activar la expresión del gen *air* (o *eaeX*) el cual se encuentra codificado aguas abajo del regulador *eilA* (Sheikh *et al.*, 2006). Mutantes *eilA* poseen una menor adherencia a distintos substratos, la cual la asociaron a una menor expresión de la proteína Air (Sheikh *et al.*, 2006). Air pertenece a familia de proteínas BID (*bacterial immunoglobulin domains*) y presenta homólogos en otras especies como *Yersinia* (proteína invasina), y en *E. coli* enteropatogénica (proteína intimina) (Sheikh *et al.*, 2006). Esta familia de proteínas parecen estar asociadas a procesos de unión a proteínas de membrana, resultando en la internalización de la célula bacteriana (Rankin *et al.*, 1992), y en los procesos de transducción de señales y en la unión de los receptores de la célula bacteriana y hospedadora (Nougayrède *et al.*, 2003). Curiosamente EilA parece actuar en la isla ETT2, activando la expresión del gen *eivF* (ortólogo de *invF* de *Salmonella*) (Sheikh *et al.*, 2006). Tal y como ha sido comentado en el apartado 1.7.2.1 de esta introducción, una vez activado por la proteína HilA, el producto génico de *invF*, la proteína InvF, es capaz de promover la expresión de las proteínas efectoras, como por ejemplo, la proteína SipA y desencadenar el proceso invasivo en células eucariotas. No obstante, la activación producida por EilA en la expresión de *eivF* no es considerada como una expresión de la isla ETT2 por completo, dado que sugieren el requerimiento de otro activador en la cascada reguladora (Sheikh *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Después de la publicación del papel de la proteína EilA como modulador de la expresión génica en la cepa de *E. coli* 042 (Sheikh *et al.*, 2006), y de la elevada similitud de secuencia aminoacídica con la proteína HilA, nos planteamos estudiar la posible relación entre ambos moduladores.

Teniendo en cuenta que la expresión de la proteína HilA está regulada por las proteínas asociadas a la cromatina H-NS y Hha, nos propusimos en primer lugar estudiar a fondo este sistema para después estudiar la regulación de *eilA* y compararlas. También planteamos estudiar si las proteínas HilA y EilA son funcionalmente intercambiables.

Finalmente, debido a un fenotipo inesperado de un mutante *hha* en la cepa de *E. coli* 042, también se ha profundizado en el papel de la proteína Hha de forma independiente a H-NS en esta cepa enteroagregativa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS

3.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 3.1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia o origen
<i>Escherichia coli</i>		
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻) supE44 relA1 λ⁻ lac⁻ (F' proA⁺ B⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10) Tc^r</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
DH5α	<i>Φ80dlacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA- argF)U169 phoA</i>	Stock de laboratorio
5KRif	<i>F⁻, hsdR, hsdM, thr, thi, rpsL, leu, lacZ, Rif^r</i>	(Nieto <i>et al.</i> , 1998)
5KRif pAA2	5KRif (pAA2 AggR::3xFLAG)	Este trabajo
MG1655Lac ⁻	MG1655 <i>lacZ</i> ::Cm	S. Aznar
MG1655 pAA2	MG1655Lac ⁻ (pAA2 AggR::3XFLAG)	Este trabajo
AAG1	MG1655 Δ <i>lacZYA</i>	(Aberg <i>et al.</i> , 2008)
AAG1A	AAG1 Δ <i>hha</i>	Este trabajo
AAG1H	AAG1 Δ <i>hns</i>	Este trabajo
AAG1IHFA	AAG1 Δ <i>ihfA</i> ::Cm	Este trabajo
AAG1IHFB	AAG1 Δ <i>ihfB</i> ::Cm	Este trabajo
AGG1HA	AAG1 Δ <i>hns</i> Δ <i>ihfA</i> ::Cm	Este trabajo
AAG1HB	AAG1 Δ <i>hns</i> Δ <i>ihfB</i> ::Cm	Este trabajo
AAG1λR <i>SeilA</i>	AAG1 con λR <i>SeilA</i> integrado	Este trabajo

	en <i>attB</i> Km ^r	
AAG1λRSygeH	AAG1 con λRSygeH integrado en <i>attB</i> Km ^r	Este trabajo
AAG1HλRSeilA	AAG1H con λRSeilA	Este trabajo
AAG1HλRSygeH	AAG1H con λRSygeH	Este trabajo
AAG1HAλRSeilA	AAG1HA con λRSeilA	Este trabajo
AAG1HBλRSeilA	AAG1HB con λRSeilA	Este trabajo
AAG1HAλRSygeH	AAG1HA con λRSygeH	Este trabajo
AAG1HBλRSygeH	AAG1HB con λRSygeH	Este trabajo
EAEC 042	Aislamiento clínico Cm ^r Sm ^r Tc ^r	Dr. Henderson
042Hha	EAEC 042 Δ <i>hha</i>	Este trabajo
042HNS	EAEC 042 Δ <i>hns</i>	Este trabajo
042EilA	EAEC 042 Δ <i>eilA</i>	Este trabajo
042YgeH	EAEC 042 Δ <i>ygeH</i>	Este trabajo
042AggR	EAEC 042 Δ <i>aggR</i>	Este trabajo
042Aap	EAEC 042 Δ <i>aap</i>	Este trabajo
042EY	EAEC 042 Δ <i>eilA</i> Δ <i>ygeH</i>	Este trabajo
042HA	EAEC 042 Δ <i>hha</i> Δ <i>aggR</i>	Este trabajo
042HP	EAEC 042 Δ <i>hha</i> Δ <i>aap</i>	Este trabajo
MHO-1	EAEC 042 <i>aafA</i> ::3XFLAG	Este trabajo
MHO-2	EAEC 042 <i>aggR</i> ::3XFLAG	Este trabajo
MHO-3	042Hha <i>aafA</i> ::3XFLAG	Este trabajo
MHO-4	042Hha <i>aggR</i> ::3XFLAG	Este trabajo
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
SV5015	SL1344 <i>his</i> ⁺	Dr. Casadesús
MHS-C1	SV5015 <i>hilA</i> ::Cm	Este trabajo
MHS-1	SV5015 Δ <i>hilA</i>	Este trabajo
SV5015H	SV5015 Δ <i>hha</i> ::Cm	(Vivero <i>et al.</i> , 2008)
SV5015AV1	SV5015 Δ <i>hns</i>	(Baños <i>et al.</i> , 2009)
SV5015HAV1	SV5015 Δ <i>hha</i> ::Cm Δ <i>hns</i>	Dra. Baños
SV5015UB2	SV5015 Φ <i>hilA-lacZY</i>	(Baños <i>et al.</i> , 2009)
SV5015UB2H	SV5015UB2 Δ <i>hha</i> ::Cm	Este trabajo

SV5015UB2AV1	SV5015UB2 Δhns	Este trabajo
SV5015UB2HAV1	SV5015UB2 $\Delta hha::Cm \Delta hns$	Este trabajo
SV5015S	SV5015 $\Delta stpA$	Este trabajo
SV5015UB2HS	SV5015UB2 $\Delta hha::Cm \Delta stpA$	Este trabajo
SV5015UB2IHFA	SV5015UB2 $\Delta ihfA::Cm$	Este trabajo
SV5015UB2IHFB	SV5015UB2 $\Delta ihfB::Cm$	Este trabajo
SV5015UB2D	SV5015UB2 $\Delta hilD::Cm$	Este trabajo
SV5015UB2CD	SV5015UB2 $\Delta hilC \Delta hilD::Cm$	Este trabajo
SV5258	SV5015 $\Phi invF-lacZY$	Dr. Casadesús
SV5258HilA	SV5258 $\Delta hilA::Cm$	Este trabajo
MHS-2	SV5015 $sipA::3XFLAG$	Este trabajo
MHS-3	MHS-1 $sipA::3XFLAG$	Este trabajo
TT1704	$\Delta his-9533$	(Torreblanca <i>et al.</i> , 1999)
LB5000	$rLT^- rSA^- rSB^-$	(Bullas & Ryu, 1983)

3.1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Referencia u origen
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>ahp</i> FRT PS1 PS2 oriR6K Km ^r Cb ^r	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 oriR6K Cm ^r Cb ^r	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 oriTS Cb ^r	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKG136	<i>ahp</i> FRT <i>lacZY+</i> <i>t_{his}</i> oriR6K	Dr. Slauch
pCP20	<i>bla cat cI857 IP_Rflp</i> pSC101 oriTS Cb ^r	(Cherepanov & W, 1995)
pSUB11	Vector utilizado de ADN molde para reacción de PCR en fusiones con el	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)

	3XFLAG	
pGEM-T easy	rep _{pMB1} P _{T7} P _{SP6} Cb ^r	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pBAD18	rep _{pMB1} P _{araBAD} Cb ^r	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBADHNS _t	pBAD18 + <i>hns</i> T _{EPEC}	Este trabajo
pBADHILA	pBAD18 + <i>hilA</i> _{SV5015}	Este trabajo
pBADEILA	pBAD18 + <i>eilA</i> _{EAEC042}	Este trabajo
pBADYGEH	pBAD18 + <i>ygeH</i> _{EAEC042}	Este trabajo
pBADIHFA _{αβ}	pBAD18 + <i>ihfA</i> _{MG1655} + <i>ihfB</i> _{MG1655}	Este trabajo
pBADHha	pBAD18 + <i>hha</i> _{SV5015}	Este trabajo
pBADAggR	pBAD18 + <i>aggR</i> _{EAEC042}	Este trabajo
pBR322	<i>ori</i> _{pMB1} Cb ^r Tc ^r	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
pUBM22	pBR322 + <i>hha</i>	(Nieto <i>et al.</i> , 1991)
pTE103	Vector para ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	(Elliott & Geiduschek, 1984)
pTEhila	Región promotora de <i>hilA</i> de SV5015 (-505 al +372) clonado en el pTE103	Este trabajo
pRS551	Vector para crear fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> , Cb ^r Km ^r	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pEILA	Región promotora de <i>eilA</i> de EAEC 042 en pRS551	Este trabajo
pYGEH	Región promotora de <i>ygeH</i> de EAEC 042 en pRS551	Este trabajo
pFZY1	F' <i>lac</i> replicon <i>lacZYA</i> ⁺ Cb ^r	(Koop <i>et al.</i> , 1987)
pHILA877	Región promotora de <i>hilA</i> de SV5015 (-505 al +372) clonado en el pFZY1	Este trabajo
pHILA505	Región promotora de <i>hilA</i> de SV5015 (-505 al +1) clonado en el pFZY1	Este trabajo
pCB1H	<i>hha</i> ⁺ pLG338-30 Cb ^r	(Balsalobre <i>et al.</i> , 1996)
pCGHNS	<i>hns</i> ⁺ pLG338-30 Cb ^r	C. Madrid

3.1.3. Bacteriófagos

En la siguiente tabla se detallan los bacteriófagos que han sido utilizados en este trabajo y sus características más importantes.

Tabla 3.3. Bacteriófagos utilizados en este trabajo.

Bacteriófago	Fenotipo relevante	Referencia u origen
P1 <i>vir</i>	Fago lítico	(Miller, 1992)
P22 HT <i>int4</i>	Fago lítico	(Schmieger, 1972)
P22 H5	Fago lítico	(Schmieger, 1972)
λRS45	Fago lisogénico	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
λRSeilA	Fago lisogénico portador de la fusión génica del plásmido pEILA	Este trabajo
λRSygeH	Fago lisogénico portador de la fusión génica del plásmido pYGEH	Este trabajo

3.2. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo han sido suministrados por la casa comercial Sigma. Las secuencias específicas son indicadas en la tabla A.I que se encuentra en el anexo de esta tesis.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS

3.3.1. Medios de cultivo

En este trabajo se han utilizado distintos medios de cultivo, cuya composición y preparación se detallan a continuación:

- LB (Muller) (Sambrook, 2001): medio de cultivo líquido utilizado de forma rutinaria para el crecimiento de *E. coli* y *S. Typhimurium*. Su composición es: 10 g/l peptona tripsica de caseína, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl.
- LB agar: medio de cultivo sólido utilizado de forma rutinaria para el crecimiento bacteriano. Se obtiene mediante la adición de 15 g/l de agar para bacteriología en medio LB.
- LB agar blando: medio de cultivo semisólido utilizado en la obtención de lisados fágicos. Se obtiene añadiendo 6 g/l de agar para bacteriología en medio LB.
- LB agar EBU: medio de cultivo sólido utilizado para la obtención de clones libres de pseudolisógenos en el proceso de transducción generada con el fago P22. Consiste del medio LB agar que una vez esterilizado se suplementa con los componentes descritos a continuación. 0,25% (p/v) Glucosa, 0,25% (p/v) K_2HPO_4 , 0,0125 g/l Azul de Evans, 0,0250 g/l Fluoresceína.
- Medio para caldo fágico: medio de cultivo líquido utilizado para mantener fagos P22 y también en la obtención de lisado fágicos. Este medio esta compuesto por los siguientes componentes: 3 g/l extracto de carne, 5 g/l peptona tripsica de caseína, 5 g/l NaCl, 0,2% (p/v) glucosa, 1X sales E.
 - Sales E: 0,8 mM $MgSO_4$, 9,5 mM ácido cítrico, 57 mM K_2HPO_4 , 17 mM $NaNH_4HPO_4$.
- Medio SOB (Hanahan *et al.*, 1991): medio de cultivo líquido utilizado como base para la preparación del medio SOC. Está compuesto por: 20 g/l peptona tripsica de caseína, 5 g/l extracto de levadura, 0,58 g/l NaCl, 0,19 g/l KCl, 20 mM $MgCl_2/MgSO_4$ (partiendo de una solución de 1M de ambas sales).
- Medio SOC (Hanahan *et al.*, 1991): medio de cultivo líquido utilizado para la recuperación de células tras el proceso de electroporación. Se obtiene al suplementar el medio SOB con 20 mM de glucosa.
- Medio DMEM (Invitrogen): medio de cultivo líquido comercial utilizado en el crecimiento y manutención de células eucariotas. Se ha utilizado en este trabajo suplementado con 0,45% de glucosa (DMEMplus).
- Medio LB:DMEM: este medio líquido está compuesto de partes iguales (1:1) de medio LB y medio DMEM.

3.3.2. Antibióticos

Todos los antibióticos descritos a continuación han sido preparados según (Sambrook, 2001). Cuando ha sido necesario, los medios de cultivos citados anteriormente han sido suplementados con antibióticos. La preparación y las concentraciones utilizadas de cada antibiótico se detallan a continuación.

- Ampicilina (Ap): se prepara una solución madre a 100 mg/ml en agua destilada y se esteriliza por filtración. Se usa a una concentración final de 25 µg/ml, 50 µg/ml o 100 µg/ml.
- Carbenicilina (Cb): se prepara una solución idéntica a la descrita para ampicilina. Se usa a una concentración final de 100 µg/ml.
- Kanamicina (Km): se prepara una solución madre a 50 mg/ml en agua destilada y se esteriliza por filtración. Se usa a una concentración final de 50 µg/ml.
- Tetraciclina (Tc): se prepara una solución madre a 12.5 mg/ml en etanol al 50% (v/v). Se usa a una concentración final de 15 µg/ml.
- Cloranfenicol (Cm): se prepara una solución madre a 100 mg/ml en etanol absoluto. Se usa a una concentración de 25 µg/ml.
- Rifampicina (Rif): se prepara una solución madre a 50 mg/ml en metanol absoluto. En este trabajo se ha utilizado a una concentración de 50 µg/ml.

3.4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1. Esterilización

Los medios de cultivo, material de vidrio y plástico, así como la mayoría de las soluciones utilizadas en este trabajo fueron esterilizadas por calor húmedo y presión en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión de vapor. En los casos en que las soluciones no permitían ser esterilizadas por calor y presión, las mismas fueron filtradas con filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro, adquiridos a la casa comercial Millipore.

Los materiales utilizados en los experimentos con ARN fueron liberados de ARNasas mediante un tratamiento con metanol y posteriormente lavado varias veces con agua MiliQ, o adquirido directamente libre de nucleasas.

3.4.2. Mantenimiento de microorganismos

Todas las cepas utilizadas en este trabajo se mantuvieron congeladas a una temperatura de -80°C en glicerol al 20% (v/v). Todos los microorganismos se reconstituyeron de la congelación a -80°C en placas de LB agar suplementado con los antibióticos pertinentes en cada caso. Estas placas se crecieron durante 16 horas a 30 o 37°C según la cepa en cuestión.

Los bacteriófagos se mantuvieron a 4°C en forma de lisado fágico en el mismo sobrenadante del cultivo del cual se obtuvo el lisado. Este lisado fágico se mantuvo estéril en presencia de unas gotas de cloroformo.

3.4.3. Inoculación y cultivo de microorganismos

Para realizar los estudios descritos en este trabajo, los cultivos fueron inoculados como se indica a continuación. El inóculo utilizado fueron colonias crecidas en placa o cultivos de toda la noche (16 horas). En el caso de inóculo a partir de placa, se obtuvo una suspensión celular a partir de colonias en LB y se utilizó dicha suspensión para inocular el medio de cultivo con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (densidad óptica a 600 nm) de 0,002. En el caso de inóculo a partir cultivos de toda la noche, este mismo fue diluido a una proporción de 1:100 ó 1:200.

En los casos en que se siguió el crecimiento bacteriano en medio líquido se llevó a cabo la medición de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de los cultivos, diluidos 1:10 en el mismo medio estéril, con el espectrofotómetro DU640 Beckman Coulter.

3.5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ADN

3.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico

De forma rutinaria, el aislamiento de ADN plasmídico se realizó utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de la casa comercial Qiagen. Este kit se basa en la metodología de lisis alcalina. El protocolo fue el descrito por el fabricante.

3.5.2. Utilización de enzimas de restricción y ligación

Las enzimas utilizadas en protocolos de restricciones y de ligación de ADN (T4 ADN ligasa) fueron obtenidas de la casa comercial Fermentas. El protocolo utilizado ha sido el descrito por el fabricante.

3.5.3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones de amplificación de ADN por PCR se utilizaron dos distintas ADN polimerasas comerciales, en función del uso posterior de dicha amplificación:

- I. Cuando se requería una elevada fidelidad en la amplificación para un posterior uso de los fragmentos amplificados, se utilizó la ADN polimerasa de alta fidelidad Ecozyme de la casa comercial Ecogen. Normalmente el protocolo utilizado constaba de una reacción con un volumen final de 25 μ l. Los reactivos para una reacción se indican a continuación: 15 μ l de agua bidestilada estéril, 2,5 μ l de tampón de amplificación x10 (Ecogen), 1 μ l de una solución de nucleótidos trifosfato (dNTP) 10 mM de cada tipo (Fermentas), 1 μ l de cada oligonucleótido 30 ng (Sigma), 1 μ l de muestra y 0,5 μ l de enzima (Ecogen).
- II. Cuando la finalidad de la amplificación por PCR era realizar un genotipado de la cepa bacteriana, se utilizó el enzima comercial DreamTaq Master Mix (Fermentas). En este caso todos los reactivos para PCR se encuentran en solución concentrada x2. El protocolo utilizado constaba de una reacción de 25 μ l de volumen final. Los reactivos para una reacción se detallan a continuación: 12,5 μ l de DreamTaq Master Mix x2, 9,5 μ l de agua bidestilada estéril, 1 μ l de cada oligonucleótido 30 ng (Sigma), 1 μ l de muestra.

Las muestras utilizadas como ADN molde en las reacciones de PCR consistieron bien en ADN plasmídico bien en el producto de amplificación de una PCR o bien en una suspensión de una colonia bacteriana en 50 μ l de agua bidestilada estéril previamente hervida 10 minutos a 100°C.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo un programa básico, en el cual la temperatura y tiempo de hibridación junto con el tiempo de extensión variaban en función de la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y del tamaño del

fragmento a amplificar. El programa básico utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. El ciclo terminaba con una ronda de extensión a 72°C durante 10 minutos.

3.5.4. Secuenciación de fragmentos de ADN

El ADN se secuenció por el método de Sanger, basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos, mediante una reacción de PCR. De forma rutinaria se utilizó el kit comercial BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. El programa de PCR utilizado para reacción fue: desnaturalización a 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, hibridación 50°C durante 5 segundos, extensión 60°C durante 4 minutos.

Las muestras tras la amplificación fueron analizadas en el secuenciador ABI Prism 3700 (Applied Biosystems), en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

3.5.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN plasmídico y los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa en una cubeta horizontal.

El gel de agarosa se preparó en tampón TBE x0,5 (45 mM Tris, 45mM Ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,3). La concentración de agarosa de los geles varió en función de los tamaños de los fragmentos de PCR a analizar. Para tamaños inferiores a 1000 nucleótidos se utilizaron geles con un 2% de agarosa, mientras que para tamaños superiores se utilizó una concentración de 0,8%. Para la visualización del ADN plasmídico se utilizaron geles con una concentración de 0,8% de agarosa, mientras que para visualizar perfiles de restricción de ADN se utilizó a una concentración de 1%.

Rutinariamente se analizaron 1/10 del volumen de la muestra conjuntamente con tampón de carga a una concentración de x1 (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylen cianol, 60% glicerol).

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo normalmente a temperatura ambiente, aplicandose un voltaje de 100V durante 35 minutos.

Tras la electroforesis, los geles fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio a 0,5 µg/ml en TBE x0,5 durante 20 minutos. Una vez teñidos los geles, se observaron bajo luz ultravioleta y se fotografiaron con el auxilio del equipo ImageMasterVDS (Pharmacia).

3.5.6. Aislamiento de fragmentos de ADN

Para el aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa, el fragmento se visualizó con una lámpara de luz UV de onda larga y baja intensidad para no dañar el ADN. A continuación se recortó el trozo de gel que contenía el fragmento de interés. De manera rutinaria, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.5.7. Marcaje radioactivo de oligonucleótidos y productos de PCR con [γ -³²P]ATP

El marcaje radioactivo de oligonucleótidos y de productos de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima comercial T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK – Fermentas). El protocolo utilizado fue el descrito a continuación siendo distinto entre los dos casos.

- El marcaje radioactivo de oligonucleótidos tuvo como finalidad la obtención del oligonucleótido HILAPEX3.2 (Tabla A.I) marcado radioactivamente, siendo el mismo utilizado en ensayos de *primer extension* (apartado 3.6.4.1). Para este marcaje se utilizaron 2 µl (5 pmol) del oligonucleótido HILAPEX3.2, 1 µl del tampón x10 T4 PNK –A, 3 µl [γ -³²P]ATP (3000Ci/mmol – 10mCi/ml), 1 µl T4 PNK y 3 µl de agua estéril. La reacción fue incubada durante 10 minutos a 37°C y la inactivación de la T4 PNK fue realizada durante 2 minutos a 90°C. Pasado este tiempo, se añadieron a la reacción 40 µl de agua estéril (llevándose a una concentración final de 200 fmol/µl). La muestra se guardó a -20°C hasta su utilización.
- El marcaje radioactivo de productos de PCR tuvo como finalidad el marcaje de productos de PCR correspondiente a la región promotora del gen *hilA* utilizado en ensayos de EMSA (apartado 3.5.8.). Para este marcaje se utilizaron 52,63 µl de producto de PCR (10 pmol), 6,5 µl del tampón x10 T4 PNK, 3 µl [γ -³²P]ATP

(3000Ci/mmol – 10mCi/ml), 1 µl T4 PNK, 1,87 µl de agua estéril. La reacción fue incubada durante 10 minutos a 37°C y pasado este tiempo la T4 PNK fue inactivada durante 2 minutos a 90°C. La PCR marcada fue guardada a -20°C hasta su uso.

3.5.8. Ensayos de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Los ensayos de EMSA o retardos en gel se utilizaron para detectar la capacidad de unión de una o más proteínas al ADN. En este trabajo se realizaron dos técnicas distintas de EMSA, las cuales se describen a continuación.

- EMSA utilizando ADN marcado con [γ -³²P]ATP. En este ensayo se utilizó el producto de PCR correspondiente al promotor del gen *hilA* marcado radioactivamente (apartado 3.5.7) juntamente con las proteínas H-NS e IHF. 35 fmol de producto de PCR marcado con [γ -³²P]ATP fueron mezclados con la proteína H-NS (gentilmente cedida por el Prof. Miquel Pons) o IHF (gentilmente cedida por el Prof. Fernando de la Cruz) en el tampón de ensayo (250 mM de HEPES pH 7,4, 350 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 µg BSA ml⁻¹, 25% glicerol (v/v)) y incubados a 37°C durante 15 minutos (20 µl volumen final). Concentraciones crecientes de las proteínas H-NS o IHF fueron añadidas cuando fue necesario y la reacción fue incubada otros 15 minutos a 37°C. Después de incubadas, se añadió a las muestras 5 µl de glicerol al 100% y las mismas fueron sometidas a una electroforesis a un voltaje de 100V en geles de poliacrilamida al 5% en tampón TBE x0,5 a 37°C durante 60 minutos. Pasada la electroforesis, el gel se secó sobre papel de filtro con secador de geles Bio-Rad 583. Con el gel seco los complejos ADN-proteína fueron visualizados utilizando el programa *Quantity One* (Bio-Rad).
- EMSA utilizando ADN “frío”. En este ensayo se utilizó el producto de PCR correspondiente al promotor de los genes *eilA* e *ygeH* juntamente con la proteína H-NS. 50 ng de ADN fueron mezclados con la proteína H-NS en el mismo tampón de ensayo descrito en el apartado anterior en un volumen de 20 µl. Concentraciones crecientes de la proteína H-NS fueron añadidas cuando fue necesario y la reacción fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente. Pasada la incubación, se añadió a las muestras 5 µl de glicerol al 100% y las mismas

fueron sometidas a una electroforesis a un voltaje de 100V en geles de poliacrilamida al 5% en tampón TBE x0,5 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la electroforesis el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio diluida a 0,5 µg/ml en tampón TBE x0,5 por 15 minutos. Los complejos ADN-proteína fueron visualizados utilizando el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

3.6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN

3.6.1. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se utilizó el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la obtención del ARN total puro, éste fue sometido a un segundo tratamiento con una ADNasa comercial DNase Turbo (Ambion). Los ARN utilizados en los experimentos de RT-PCR (apartado 3.6.3.) fueron extraídos a partir de 1 ml de cultivo bacteriano. Tales cultivos fueron crecidos hasta una DO_{600nm} de 0,4 y 2,0, sedimentados tras un pulso en microcentrífuga (13.400 rpm) y congelados a -80°C o procesados inmediatamente.

3.6.2. Cuantificación del ARN total purificado

La cuantificación del ARN total se llevó a cabo mediante la determinación de la DO_{260nm} con el auxilio del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop).

3.6.3. RT-PCR

Para el análisis cuantitativo del ARN por la técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), el ARN del gen objeto de estudio se retro-transcribió a ADN con la acción de una transcriptasa inversa comercial y posteriormente éste se amplificó por PCR. Para esta técnica se utilizó el kit comercial Transcriptor One-Step RT-PCR (Roche), que suministra todos los reactivos necesarios para la reacción de retro-transcripción, así como para la amplificación del ADNc (ADN complementario) sintetizado, exceptuando los oligonucleótidos y el ARN. Primeramente se determinó,

mediante una curva de saturación, la concentración de ARN a ser utilizada del gen objeto de estudio. Antes de añadir la dilución de ARN con la concentración apropiada se incubó durante 5 minutos a 90°C en el “*thermo-block*”, y se mantuvo en hielo hasta el momento de ser utilizada. Las cantidades de cada reactivo en la reacción de RT-PCR se describen a continuación: 5 µl del tampón x5, 1 µl oligonucleótido positivo, 1 µl oligonucleótido negativo, 0,5 µl del mix de enzimas, 15,5 µl de agua estéril, 2 µl de ARN (concentración dependiente de cada gen objeto de estudio). Para asegurar que la muestra no contuviese ningún resto de ADN fue necesario hacer un control que consistió en inactivar la transcriptasa inversa durante 10 minutos a 95°C, y comprobar que no se producía amplificación debido a la presencia de ADN en la muestra. El programa de RT-PCR utilizado fue el descrito a continuación, retro-transcripción por 15 minutos a 50°C, inactivación de la transcriptasa reversa por 10 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, hibridación por 30 segundos a 55°C, elongación por 30 segundos a 68°C. A continuación se realizaron 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, hibridación por 30 segundos a 55°C, elongación a 68°C por 30 segundos (+ 1 segundo por ciclo). Finalización del ciclo de PCR con una elongación de 7 minutos a 68°C.

3.6.4. Estudios de transcripción *in vitro*

Para determinar el posible papel antagonista de IHF sobre el efecto represor de H-NS en el promotor del gen *hilA* de la cepa SV5015 se realizaron ensayos de transcripción *in vitro*. Los estudios de transcripción *in vitro* se llevaron a cabo utilizando como molde ADN plasmídico superenrollado (pTEhilA). El enzima ARN polimerasa (ARNpol) se obtuvo de la casa comercial USB. Las proteínas H-NS y IHF se obtuvieron tales como se ha descrito en el apartado 3.5.8. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 37°C en tampón de transcripción (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 25 µg/ml⁻¹ BSA).

Los ensayos de uno solo ciclo de transcripción se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl. 150 ng del plásmido pTEhilA fueron incubados en presencia de 200 µM de cada uno de los ribonucleótidos trifosfatos (rNTP), 5 unidades (U) de ARN pol juntamente con las proteínas H-NS e IHF añadidas en conjunto o por separado tal y como se indica en la figura 4.9 del apartado de resultados. En su caso, la proteína IHF

fue incubada en presencia del tampón de transcripción durante 10 minutos a 37°C previamente a la reacción. Pasado este tiempo, la proteína H-NS fue añadida a la reacción y ésta incubada durante 10 minutos a 37°C. Después de la última incubación, 5 U de ARNpol fueron añadidas a la reacción, incubándose nuevamente durante 10 minutos a 37°C, para así permitir la correcta interacción del enzima con el promotor. En este punto, los rNTPs rATP, rCTP y rUTP fueron añadidos a la reacción. En ausencia del rGTP la ARNpol debería quedarse parada en la posición +17 desde el inicio de transcripción, debido que la primera guanosina que se encuentra después del inicio de transcripción está en esta posición. Pasados 2 minutos de incubación a 37°C, 100 ng/μl⁻¹ de heparina (SIGMA) y rGTP fueron añadidos. La reacción fué continuada durante 20 minutos a 37°C y se paró la misma inactivando la ARNpol a 75°C por 10 minutos.

3.6.4.1. Ensayos de *Primer Extension*

Los ARN sintetizados *in vitro* fueron utilizados como molde para los ensayos de *Primer Extension*. Para cada reacción se utilizaron 12,6 μl del transcrito juntamente con 1,5 μl del oligonucleótido HILAPEX3.2 marcado con [γ -³²P]ATP (300 fmol de concentración final). La reacción fue incubada a 70°C por 5 minutos para desestructurar posibles estructuras secundarias de la molécula de ARN y luego mantenida en hielo. Previamente a la reacción de transcripción inversa se trató la reacción con un inhibidor de ARNasas añadiendo a esta reacción 0,1 μl RNAsin (Promega) juntamente con 4 μl del tampón de transcripción x5, 0,8 μl de una mezcla de los cuatro dNTPs a 25 mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) y mantenido a 37°C por 5 minutos. Pasado este tiempo, 1 μl de transcriptasa inversa fue añadido a cada reacción e incubado a 42°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo se pararon las reacciones mediante la adición de 10 μl del tampón de carga/parada (95% formamida, 0,025 % xylene cyanol, 0,025% azul de bromofenol) y las muestras fueron calentadas 2 minutos a 95°C y mantenidas en hielo. 20 μl de las muestras en frío fueron sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% conteniendo urea a 7M. Después de la electroforesis (100V por 60 minutos) los geles se secaron sobre papel filtro con secador de geles Bio-Rad 583. Con el gel seco, las bandas fueron visualizadas utilizando el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

3.6.5. Secuenciación masiva de ARN de las cepas 042 salvaje y mutante *hha*

La secuenciación masiva de ARNm de la cepa salvaje de *E. coli* 042 y el respectivo mutante *hha* se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Fernando de la Cruz (Universidad de Cantabria – Santander, España). Para ello se hicieron crecer las cepas salvaje y mutante *hha* en medio LB a 25°C y a 37°C hasta una D.O.₆₀₀ de 2,0. Se recogieron réplicas de 1 ml de células y a cada una se añadieron 2 ml de la solución RNAprotect Bacterial Reagent (Qiagen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Pasado el tiempo de incubación los cultivos fueron centrifugados y congelados inmediatamente en nieve carbónica.

El ARN total fue aislado de las respectivas muestras utilizando el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Se volvieron a tratar las muestras de ARN aisladas con una segunda ADNasa (Turbo DNA-free DNase, Ambion) para garantizar la completa eliminación del ADN cromosómico. La calidad de la extracción de ARN total se analizó utilizando el kit comercial Experion RNA Analysis Kit (Bio-Rad) en el aparato Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad).

El enriquecimiento de la fracción de ARNm de las muestras de ARN total fue realizado utilizando el kit comercial MICROBExpress (Ambion) basándose en las recomendaciones del fabricante. Se volvieron a analizar las muestras de ARNm enriquecidas de manera similar al descrito en el párrafo anterior y así se determinó la completa eliminación del ARNr.

Para la construcción de la librería se utilizó el kit comercial ScriptSeq™ mRNA-Seq Library Preparation Kit (Illumina®-compatible) de la casa comercial Epicentre, basándose en las recomendaciones del fabricante. Estas librerías se analizaron con el aparato Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) utilizando el kit comercial Agilent High Sensitivity DNA kit para garantizar las especificaciones necesarias para la secuenciación. La cuantificación de las librerías se llevó a cabo utilizando Real-time PCR utilizando el equipo iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Posteriormente se llevó a cabo el preparado de “*Flow Cell*” utilizando el kit comercial Illumina TruSeq SR Cluster Kit v5-CS-GA utilizando el aparato Illumina Cluster Station, ambos de la casa comercial Illumina. La secuenciación del *Flow Cell* se llevó a cabo utilizando el aparato Illumina Genome Analyser II (Illumina).

3.6.5.1. Análisis estadístico

Se usaron los archivos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) FN554766 y FN554767 para alinear las secuencias frente al cromosoma y el plásmido (pAA) de la cepa de *E. coli* 042. Las secuencias fueron alineadas usando el programa BOWTIE (Langmead *et al.*, 2009) permitiendo un máximo de tres “*mismatch*” y seleccionando solo el mejor de los “*hits*” obtenidos. Posteriormente, se calcularon los RPKM según (Mortazavi *et al.*, 2008) y se realizó un análisis estadístico usando el paquete informático DESeq/Bioconductor (Anders & Huber, 2010).

3.7. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA

3.7.1. Transformación bacteriana

Para llevar a cabo la transformación de células bacterianas se obtuvieron células competentes mediante tratamiento con CaCl₂ o por electroporación.

3.7.1.1. Transformación bacteriana de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂ (Cohen *et al.*, 1972)

Para la obtención de células competentes por tratamiento con CaCl₂ se partió de un cultivo crecido en medio LB en agitación hasta la fase exponencial temprana (D.O._{600nm} de 0,3). A continuación se centrifugaron 10 ml del cultivo a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de células obtenido se resuspendió en el mismo volumen de 50 mM CaCl₂ frío y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento ahora obtenido se resuspendió en 5 ml de CaCl₂. El proceso se repitió dos veces más, resuspendiendo en 2,5 y 1 ml de CaCl₂ sucesivamente. Finalmente, las células obtenidas se resuspendieron en 500 µl de CaCl₂. Esta suspensión se mantuvo en hielo un mínimo de 30 minutos antes de su utilización.

Para la transformación se tomaron 100 µl de células competentes y se mezclaron con un volumen de 1-10 µl de una suspensión de ADN. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo. A continuación se sometió la mezcla a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos. Se añadió medio LB hasta un volumen de 1 ml. Para permitir la

expresión fenotípica de los genes marcadores de resistencia a antibiótico de las células transformadas, la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora o a 30°C durante 1 hora 30 minutos. Por último, se seleccionaron las células que habían adquirido el plásmido en medio LB agar suplementado con el antibiótico adecuado para el plásmido transformado.

3.7.2. Electroporación (Dower *et al.*, 1988)

Este método permite la captación de ADN mediante la permeabilización de las membranas bacterianas provocada por una descarga eléctrica.

Se partió de un cultivo en medio LB a una D.O._{600nm} de 0,6. Se centrifugaron 10 ml del cultivo a 4°C, resuspendiendo el sedimento en glicerol al 10% frío. Se realizaron varias centrifugaciones. Con cada una de ellas se disminuía el volumen en el que se resuspendían las células, siendo 1, 0,5, 0,25, 0,1 y finalmente 0,01 volúmenes respecto al inicial. De esta forma se pretendía concentrar las células y disminuir la fuerza iónica de la suspensión celular, eliminando las sales en solución. Las células se mantuvieron en hielo hasta su utilización. Se mezclaron 20-30 µl de células con 2-5 µl de la suspensión de ADN. El electroporador utilizado fue el Electroporator 2510 (Eppendorf), y se utilizó un voltaje de 1250 voltios, con pulsos de 5,4 a 5,8 ms.

Una vez realizada la descarga eléctrica se resuspendieron las células en 1 ml de medio SOC, y se incubó a 30°C o 37°C para permitir la recuperación de las células. Tras la incubación, las células transformadas se seleccionaron en medio LB agar suplementado con los antibióticos correspondientes.

3.7.3. Transducción generalizada con bacteriófagos utilizados en *E. coli*

3.7.3.1. Bacteriófago P1vir (Willetts *et al.*, 1969)

El bacteriófago P1vir es un derivado virulento del bacteriófago P1, el cual ha perdido la capacidad lisogénica. Este bacteriófago se utilizó para introducir, por recombinación homóloga, mutaciones que lleven asociadas un marcador de resistencia a un antibiótico. Como paso previo a la transducción se tuvo que obtener un lisado fágico procedente de la cepa portadora de la mutación.

3.7.3.2. Obtención de lisados de P1vir

Se hizo un crecimiento en medio LB de la cepa portadora de la mutación de interés hasta una D.O._{600nm} de 0,5. 0,5 ml de este cultivo se mezclaron con 0,1 ml de un lisado de P1vir preexistente. Se añadió posteriormente 3 ml de LB agar blando suplementado con 5 mM CaCl₂ y se extendió la mezcla en una placa de LB agar. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 2 ml de LB y se lavó la superficie de las placas, recogiendo el agar blando. Se introdujo la suspensión de agar blando y LB en un tubo de centrifuga junto con unas gotas de cloroformo. El tubo se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el agar y los restos celulares. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo, se le añadieron unas gotas de cloroformo y se agitó nuevamente. La suspensión se centrifugó otra vez y se retiró el sobrenadante, el cual volvió a ser agitado con unas gotas de cloroformo. El lisado obtenido se conservó a 4°C.

3.7.3.3. Titulación de lisados de P1vir

Se utilizó como cepa indicadora la cepa AAG1. Se partió de un cultivo de esta cepa crecida en LB a 37°C hasta llegar a una D.O._{600nm} de 0,8. Se centrifugó el cultivo y se resuspendieron las células en ½ del volumen inicial de medio de adsorción (10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂). Se hicieron diluciones seriadas del lisado fágico en NaCl al 0,15%. Se mezclaron 100 µl de la suspensión de células con 100 µl de cada una de las diluciones del lisado fágico y se incubó la mezcla 20 minutos a 37°C para permitir la adsorción del fago. A continuación se añadieron 2 ml de LB agar blando y se extendió en placas de LB agar. Se incubaron toda la noche a 37°C. La titulación del lisado se hizo a partir del recuento de las calvas de lisis.

3.7.3.4. Transducción con P1vir

Se creció en LB la cepa receptora hasta una D.O._{600nm} de 0,4. Se centrifugaron 10 ml de cultivo y se resuspendió el sedimento en 1 ml de LB. Se mezclaron 0,5 ml de esta suspensión celular con 0,5 ml de diferentes diluciones del lisado para tener diferentes multiplicidades de infección (generalmente 1:1 y 1:0,1) y 0,5 ml de una

solución de 15 mM CaCl₂ y 30 mM MgSO₄. A continuación se incubó la mezcla a 37°C durante 20 minutos.

Tras la incubación se centrifugaron las células y se resuspendieron en el mismo volumen de 0,15% NaCl. Se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron esta vez en 0,3 ml de 0,15 % NaCl. Se sembraron las células en placas de LB agar suplementadas con los antibióticos necesarios para seleccionar las células transductantes y se incubaron a 30°C o 37°C, dependiendo de la cepa, durante toda la noche.

3.7.3.5. Inserción de fusiones transcripcionales en el *locus attB* del cromosoma de *E. coli*

Para la inserción de fusiones transcripcionales en el cromosoma de *E. coli* se utilizó el sistema descrito por (Simons *et al.*, 1987). Este método consiste en clonar la región promotora del gen objeto de estudio en el plásmido pRS551. Este plásmido contiene un gen *lacZ* carente de región promotora y precedido de la región multiclonaje en la cual se clona dicha región promotora. A continuación del gen *lacZ* se encuentra un gen de resistencia a la kanamicina. Posteriormente, la construcción [promotor:*lacZ* + gen de resistencia a kanamicina] se introduce en el genoma de un derivado del bacteriófago λ , λ RS45, que se integrará como profago en el lugar *attB* del cromosoma de *E. coli* y con él la fusión transcripcional construida.

3.7.3.5.1. Construcción de la fusión transcripcional en el plásmido pRS551

La región promotora a clonar en el plásmido pRS551 fue amplificada por PCR como se describe en el apartado 3.5.3. Durante la amplificación se añadieron las dianas de restricción para *EcoRI* y *BamHI* (para la secuencia promotora del gen *eilA*) y *BamHI* (para la secuencia promotora del gen *ygeH*), aguas arriba y aguas abajo de la región promotora respectivamente. Los fragmentos de PCR obtenidos de la reacción de PCR fueron purificados utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones de fabricante. A continuación se llevó a cabo una digestión de los productos de PCR purificados, juntamente con el plásmido pRS551, con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (para el gen *eilA*) y *BamHI* (para el gen *ygeH*). Una vez los productos de PCR y el plásmido pRS551 fueron tratados con los enzimas de restricción, los mismos fueron purificados utilizando el mismo kit comercial citado

anteriormente en este apartado. A continuación los fragmentos de PCR juntamente con el plásmido pRS551 fueron sometidos a una reacción de ligación. Esta reacción se realizó a través del uso del enzima comercial T4 ADN ligasa (Fermentas) en una reacción de 10 μ l y el protocolo utilizado fue el indicado por el fabricante.

3.7.3.5.2. Transferencia de las fusiones transcripcionales del plásmido pRS551 al bacteriófago λ RS45

Las fusiones transcripcionales fueron transferidas al bacteriófago λ RS45 por recombinación homóloga *in vivo*. Para ello se creció la cepa de *E. coli* portadora del plásmido con la fusión transcripcional durante toda la noche en LB suplementado con 0,2% de maltosa. Se infectaron 200 μ l de este cultivo con 100 μ l de una suspensión de fagos λ RS45 conteniendo 10^7 partículas fágicas aproximadamente. Se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37°C para permitir la adsorción del fago a la bacteria. Se añadieron 3 ml de agar blando y se extendió la mezcla en placas de LB agar. Se incubaron las placas a 37°C durante 7-8 horas. A continuación se añadieron 3 ml de tampón TM (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgSO₄) a las placas y se incubaron a 4°C durante 2 horas. La suspensión de agar blando y tampón TM fue transferida a un tubo de centrifuga y se homogenizó el agar blando junto con unas gotas de cloroformo. El tubo se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo, se le añadieron unas gotas de cloroformo y se agitó nuevamente. La suspensión se centrifugó otra vez y se retiró el sobrenadante, el cual volvió a ser agitado junto con unas gotas de cloroformo. El lisado obtenido se conservó a 4°C hasta su utilización.

3.7.3.5.3. Obtención de lisógenos que contengan una fusión transcripcional en el locus *attB* del cromosoma

Se creció la cepa receptora en LB suplementado con 0,2% de maltosa hasta fase estacionaria. Se mezclaron 200 μ l de este cultivo con 100 μ l (10^7 ufc) de una dilución del fago recombinante que contenía la fusión transcripcional de interés. Se incubó la mezcla a 37°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se hizo un lavado con tampón TM para eliminar las partículas fágicas que no se habían adherido, y se resuspendieron las células en 300 μ l de tampón TM. A continuación, se sembraron las

células en LB suplementado con kanamicina, incubándose posteriormente durante 16 horas a 37°C.

Los lisógenos obtenidos se genotiparon por PCR para comprobar que únicamente se había integrado un solo fago en el lugar *attB* del cromosoma de *E. coli*, siguiendo el procedimiento descrito por (Powell *et al.*, 1994).

3.7.4. Transducción generalizada con bacteriófagos utilizados en *S. enterica* serovar Typhimurium (bacteriófago P22)

El bacteriófago P22 HT *int4* (Schmieger, 1972) se utilizó en este trabajo para introducir mutaciones en las cepas por recombinación homóloga. Este fago P22 presenta dos mutaciones, HT e *int*, que le confieren respectivamente una elevada frecuencia de transducción, y una deficiencia en la integración del ADN del bacteriófago en el cromosoma de la cepa receptora, evitando así la lisogenia.

3.7.4.1. Obtención de lisados de P22

Un cultivo de toda la noche de la cepa dadora (0,5 ml) se mezcló con 2 ml de caldo de P22, y se incubó a 37°C de 8 a 16 horas en agitación a 200 rpm. Aunque durante esta incubación se produce lisis celular, la turbidez del cultivo no disminuye. Posteriormente se centrifugó la mezcla (3000 rpm durante 25 minutos) para eliminar las células. Se recogió el sobrenadante, donde quedan las partículas fágicas, y después de añadir unas gotas de cloroformo, se agitó vigorosamente en un vórtex e se guardó a 4°C hasta su utilización.

3.7.4.2. Titulación del lisado fágico

Se mezclaron 200 µl de un cultivo de la cepa hospedadora en fase exponencial (D.O._{600nm} 0,3), con 100 µl de diluciones seriadas del lisado fágico en 10 mM MgSO₄. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 20 minutos para permitir la adsorción del fago. Acto seguido se les añadieron 2,5 ml de LB agar blando, vertiéndolo todo rápidamente después de mezclar sobre una placa de LB, que se incubó a 37°C hasta la aparición de calvas de lisis.

3.7.4.3. Transducción con P22

Las transducciones con P22 llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en medio líquido. Se realizó una mezcla en un tubo de 1,5 ml de volúmenes iguales de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora y del lisado fágico obtenido sobre la cepa dadora o diluciones del mismo en 10 mM MgSO₄ (normalmente 10⁻¹ y 10⁻²). A continuación se incubaron a 37°C sin agitación durante 30 minutos para permitir la infección del fago, y se sembraron en placas de LB agar conteniendo los marcadores de resistencia a antibióticos transferidos por recombinación homóloga.

Es posible que en el proceso de transducción una célula transductante sea infectada de nuevo por el fago P22, dando como resultado un pseudolisógeno y, aunque éste sea deficiente para sus funciones de integración en el cromosoma, puede pasar en este caso que el ADN de P22 se acabe integrando. Estas cepas se vuelven resistentes a subsiguientes infecciones con el fago P22, por lo que no se podrán utilizar en experimentos de transducción. Por esto, después de una transducción con P22 fue necesaria una selección de colonias libres de pseudolisógenos, que se realizó sembrando en placas EBU. En estas placas se pueden distinguir las colonias con pseudolisógenos, que tienen un color verde oscuro, de las que están libres de ellos, de color verde más claro. El color verde oscuro es debido a la lisis por el fago P22 que libera productos ácidos, haciendo virar un indicador de pH que contiene el medio. Así, se siembran dos o tres estrías sucesivas a partir de colonias verde claras.

Tras el paso por placas EBU, se realizó una última prueba para comprobar que los transductantes estuvieran totalmente libres de pseudolisógenos, sometiéndolos a un test de sensibilidad al bacteriófago P22 H5. La mutación en el gen c2 que presenta este derivado virulento de P22 hace que produzca calvas de lisis claras. Para este ensayo se realizó una estría a partir de un lisado de P22 H5 en una placa de LB. En esta misma placa se sembraron la cepa TT1704, como control, y la cepa transductante, haciendo dos estrías paralelas que cruzasen perpendicularmente la estría de P22 H5. Después de incubar la placa 18-24 horas a 37°C, se observa cómo las cepas sensibles a la infección, y por lo tanto libres de pseudolisógenos, crecen solamente hasta llegar a la estría de P22 H5, mientras que las cepas con P22 integrado son resistentes a la infección y pueden crecer cruzando la estría de P22 H5.

3.7.5. Conjugación

La conjugación se utilizó en este trabajo para transferir el plásmido pAA2 de la cepa de *E. coli* 042 a otras cepas bacterianas. El plásmido pAA2 *per se* no codifica para ningún marcador de resistencia a antibióticos. Basado en esto, se utilizó la construcción AggR::3XFLAG presente en un derivado del plásmido pAA2 (AggR::3XFLAG) el cual lleva asociado la resistencia al antibiótico kanamicina con la etiqueta 3XFLAG, y así esta construcción nos sirvió como marcador de selección de los transconjugantes. Primeramente se conjugó el plásmido pAA2 AggR::3XFLAG a la cepa de *E. coli* 5KRif, para poder seleccionar los transconjugantes resistentes a kanamicina y rifampicina, ya que la cepa de *E. coli* 042 no posee resistencia a rifampicina. Para esto, se crecieron 5 ml de cada cultivo durante toda la noche en medio LB Km 50 µg/ml para la cepa dadora (042 AggR::3xFLAG) y en medio LB Rif 50 µg/ml para la cepa receptora 5KRif. A continuación se centrifugaron los cultivos a 6000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en el mismo volumen inicial (5 ml) de 10mM MgSO₄. Se repitieron dos veces más estos pasos de lavados y finalmente se resuspendieron las células en 200 µl de MgSO₄ 10mM. A continuación se mezclaron partes iguales de ambas cepas, es decir, 100 µl de cada cepa en un tubo de 1,5 ml. Se agitó suavemente, y posteriormente se recogieron los 200 µl y se aplicaron sobre filtros de nitrocelulosa de 0,22 µM (Millipore) previamente colocados sobre el agar en placas de LB agar. Se incubaron 6 horas a 37°C para permitir la conjugación. Posteriormente se recogieron los filtros de nitrocelulosa y se pusieron en tubos de 10 ml estériles. A los tubos se les añadieron 1 ml de MgSO₄ 10mM y se agitaron en vórtex durante 1 minuto. Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión de células en MgSO₄ 10mM y se sembraron las diferentes diluciones en placas de medio LB suplementados con kanamicina y rifampicina ambas a 50 µg/ml para seleccionar los transconjugantes en 5KRif.

Posteriormente se conjugó el plásmido pAA2 AggR::3XFLAG presente en la cepa 5KRif a la cepa de *E. coli* MG1655 *lacZ*::Cm. El protocolo utilizado fue básicamente el mismo descrito anteriormente en este apartado con la precisión de que la selección de los transconjugantes se hizo en presencia de kanamicina 50 µg/ml (marcador de la etiqueta 3XFLAG) y cloranfenicol 30 µg/ml (marcador de la mutación en el gen *lacZ*). Todos los transconjugantes fueron confirmados por PCR utilizando

oligonucleótidos específicos para la construcción AggR::3XFLAG. No obstante, también se confirmaron que todos los transconjugantes no fueran resistentes espontáneos a los distintos antibióticos utilizados de la cepa de *E. coli* 042 pAA2 AggR::3XFLAG. Para esto se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el patotipo de *E. coli* 042 (oligonucleótidos She 5' - She 3').

3.8. MÉTODO DE MUTAGÉNESIS BACTERIANA

3.8.1. Inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR

Con este método es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a un antibiótico generado con una reacción de PCR. Se utilizan oligonucleótidos que permiten la amplificación del gen de resistencia al antibiótico flanqueado por secuencias FRT, y se introducen extensiones homólogas correspondientes al lugar del genoma que se quiere reemplazar. Estas extensiones permiten la recombinación con las regiones flanqueantes al gen catalizada por la recombinasa Red. Después de la selección de mutantes, la resistencia puede ser eliminada utilizando el plásmido auxiliar pCP20 que codifica la recombinasa FLP, la cual actúa sobre la repetición directa FRT adyacente al gen de la resistencia (Datsenko & Wanner, 2000), permitiendo de esta manera su eliminación.

3.8.2. Generación del fragmento de PCR conteniendo un gen de resistencia a antibióticos

Los genes de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3 o a kanamicina del pKD4 se amplificaron utilizando oligonucleótidos que en el extremo 3' contenían secuencias complementarias al plásmido y en el extremo 5' secuencias de 42 nucleótidos homólogas al gen objeto de delección. De esta forma se generó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia al antibiótico flanqueado por las secuencias FRT y secuencias homólogas al gen a mutagenizar en cada extremo. Tras la amplificación el fragmento de PCR fue tratado con el enzima de restricción *DpnI* para eliminar la posible contaminación con el ADN molde utilizado en la PCR. Después el fragmento se purificó como se indica en el apartado 3.5.6.

3.8.3. Reemplazamiento alélico

El plásmido pKD46 codifica para la recombinasa Red del fago λ , cuya expresión se encuentra bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa. Además, este plásmido tiene un origen de replicación termosensible. La recombinasa Red, aparte de favorecer la recombinación, inhibe la exonucleasa V celular, permitiendo así la entrada a la célula de fragmentos de ADN lineal sin ser degradados.

Se hizo crecer la cepa a mutagenizar, transformada previamente con el plásmido pKD46, a 30°C en medio SOB suplementado con 10 mM L-arabinosa, 10mM Mg^{+2} (se partió de una solución 1M $MgSO_4$ y 1M $MgCl_2$) y ampicilina 100 $\mu g/ml$ hasta una D.O._{600nm} de 0,6. Se obtuvieron células electrocompetentes, las cuales se electroporaron con 10-100 ng y 1 μg respectivamente del fragmento de ADN generado por PCR. Tras el pulso eléctrico, las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se incubaron a 37°C para favorecer la recombinación y permitir la recuperación de las bacterias tras el choque eléctrico. Se sembró la mitad de la suspensión en placas de LB agar suplementadas con cloranfenicol o kanamicina según el caso. La otra mitad se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche y se sembraron al día siguiente en placas de LB agar similares. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Durante la incubación a 37°C se produce el curado del plásmido pKD46, ya que presenta un origen de replicación termosensible. Las colonias resistentes a los marcadores utilizados fueron genotipadas por PCR.

3.8.4. Eliminación del casete de resistencia al antibiótico

Una vez comprobada la mutación, en algunos casos se quiso eliminar el gen de resistencia a antibióticos. Para ello se transformó la cepa mutante con el plásmido pCP20, codificante para la recombinasa FLP y cuya expresión es inducible por temperatura (30°C). Este plásmido codifica para resistencias a cloranfenicol y ampicilina, y tiene un origen de replicación termosensible. La transformación se sembró en LB agar suplementado con ampicilina a una concentración de 50 $\mu g/ml$. Las placas se incubaron a 30°C durante toda la noche. Los transformantes se sembraron en LB agar y se incubaron a 42°C. La incubación a esta temperatura induce la expresión de la recombinasa FLP y la consiguiente eliminación del gen de resistencia al antibiótico flanqueado por secuencias FRT, así como la pérdida del plásmido, ya que tiene un

origen de replicación termosensible. Para comprobar la pérdida tanto del plásmido como de la resistencia insertada en el cromosoma, se hicieron sucesivas estrías en medio LB agar incubando las placas a 42°C. Tras tres o cuatro pases, se comprobó la pérdida de los marcadores utilizados para la mutación y del plásmido pCP20 mediante un pase simultáneo en placas LB agar suplementado con cloranfenicol o kanamicina para comprobar la pérdida del plásmido. Finalmente, las cepas mutantes fueron genotipadas por PCR.

3.8.5. Construcción de fusiones génicas con el gen *lacZ* mediante la recombinasa FLP

Para la creación de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* se siguió el método descrito por (Ellermeier *et al.*, 2002). Este método parte del protocolo de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR descrito anteriormente (apartado 3.8.1.). A los clones mutantes carentes del casete de resistencia a antibióticos se les transformó de nuevo el plásmido pCP20 y, a continuación, el plásmido pKG136, el cual contiene un gen *lacZ* carente de promotor precedido por una secuencia FRT y un gen de resistencia a kanamicina. La replicación de estos plásmidos es dependiente de la proteína λ pir, con lo que no pueden replicarse en el interior de una célula que carezca de dicha proteína. De esta manera, al seleccionar clones resistentes a la kanamicina se obtuvieron aquellos que habían incorporado, por acción de la recombinasa FLP, el plásmido en la secuencia FRT previamente introducida en el gen deseado.

3.8.6. Construcción de fusiones génicas con la secuencia codificante para 3XFLAG mediante la recombinasa FLP

La inserción de una etiqueta 3XFLAG en el extremo carboxi-terminal de una proteína posibilita la detección a través de ensayos inmunológicos (*western blot*) de una proteína nativa en el cromosoma bacteriano utilizando un anticuerpo monoclonal comercial específico contra esta etiqueta. De esta manera no se hace necesario obtener un antisuero específico contra la proteína objeto de estudio, disminuyendo el tiempo y los costos de tal técnica.

Para la creación de fusiones génicas con la secuencia codificante para 3XFLAG se siguió el método descrito por (Uzzau *et al.*, 2001). Este método parte del protocolo de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR descrito en el apartado 3.8.1, con algunas modificaciones. Para cada gen a ser fusionado con la secuencia codificante para 3XFLAG, se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar las secuencias codificantes para la etiqueta y para resistencia a kanamicina del plásmido pSUB11. El extremo 3' de los oligonucleótidos fue complementario a los 20 primeros nucleótidos del plásmido pSUB11 que corresponden a la secuencia codificante para el 3XFLAG (GACTACAAAGACCATGACGG) en el caso del oligonucleótido “*forward*” y en el caso del oligonucleótido reverso, complementarios a los 20 nucleótidos del “*priming site*” 2 del plásmido pSUB11 (CATATGAATATCCTCCTTAG). El extremo 5' de los oligonucleótidos “*forward*” fueron diseñados conteniendo la secuencia de los últimos 40 nucleótidos del gen a fusionar con el 3XFLAG, sin incluir la secuencia del codón de parada y, en caso del extremo 5' de los oligonucleótidos inversos, se incluyó los 40 primeros nucleótidos aguas abajo del codón de parada. De esta forma se generó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia al antibiótico flanqueado aguas arriba por la secuencia codificante para el epítipo 3XFLAG y aguas abajo flanqueado por la secuencia complementaria tras el codón de parada. Tras la PCR el fragmento de ADN fue tratado con el enzima de restricción *DpnI* para eliminar la posible contaminación con el ADN molde utilizado en la PCR. Después el fragmento se purificó como se indica en el apartado 3.5.6.

El reemplazamiento alélico se llevó a cabo de acuerdo con el descrito en el apartado 3.8.3.

3.9. TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS

3.9.1. Precipitación de proteínas secretadas

Este método se utilizó para detectar por electroforesis en geles de poliacrilamida la expresión de varias proteínas secretadas por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Para ello se utilizaron cultivos bacterianos de los que se recuperaron las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se hizo pasar por filtros de 0,22 μm (Millipore) y las proteínas presentes se precipitaron

por incubación durante 1 hora en hielo tras la adición de ácido tricloroacético frío a una concentración final de 10%. A continuación, se centrifugó la muestra 10 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se añadió acetona fría. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento de proteínas en tampón de proteínas x1, preparado a partir de un concentrado x4 (20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 4,6% SDS, 125 mM Tris, 0,2% azul de bromofenol). La presencia de restos de ácido tricloroacético provocó un viraje de color del tampón de proteínas de azul a amarillo. Para neutralizar el pH de la muestra se añadió Tris-Base saturado hasta recuperar el color azul de la muestra (normalmente 2 μ l de esta solución).

3.9.2. Obtención de extractos totales

Este método se utilizó para detectar varias proteínas intracelulares objeto de este estudio. Se recogieron las células de un cultivo por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió en el mismo volumen de NaCl al 0,9%. Se cogió 1 ml de esta suspensión y se centrifugó de nuevo 1 minuto a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se retiró y el sedimento se resuspendió en un volumen de tampón de proteínas x1 dependiendo de la D.O._{600nm} que tuviese el cultivo, según la siguiente relación: $D.O._{600nm}/4 = \text{Volumen de tampón de proteína x1 (ml)}$.

De esta manera se consiguió una normalización de la concentración de proteína atendiendo a la biomasa de los cultivos. Una vez resuspendido el sedimento celular en el tampón de proteínas, se hirvió en agua durante 10 minutos para lisar las células.

3.9.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Este tipo de geles separa las proteínas en función de su peso molecular. Para la realización y electroforesis de estos geles se utilizó el equipo Miniprotean II de Bio-Rad.

Los geles de poliacrilamida están formados por dos fases separadas, de función y composición diferentes:

- Fase de compactación: situada en la zona superior del gel, y es donde se cargan las muestras para realizar la electroforesis. Está compuesta por un 5% de

poliacrilamida y tiene un pH de 8,8. Su función es compactar todas las proteínas de la muestra en un solo frente antes de entrar en la siguiente fase.

- Fase de resolución: situada en la zona inferior del gel. Su función es la de separar las proteínas en función de su peso molecular. En este trabajo se utilizaron geles que contenían desde un 10% hasta un 15% de acrilamida y un pH de 6,8.

La composición de las diferentes fases de los geles de acrilamida se detallan a continuación:

Fase compactación	5%
Acrilamida/Bis 30,8% T 2,6% C (Bio-Rad)	0,8 ml
Tampón de compactación x4	1,25 ml
Agua bidestilada	2,92 ml
APS10%	35 µl
TEMED	10 µl

Fase resolución	10%	12,5%	15%
Acrilamida/Bis 30,8% T 2,6% C (Bio-Rad)	2 ml	2,5 ml	3 ml
Tampón de resolución x4	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Agua bidestilada	2,5 ml	2 ml	1,5 ml
APS10%	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida

%C: Porcentaje de bisacrilamida respecto a T

Para preparar el gel se añadió primero la fase de resolución hasta $\frac{3}{4}$ partes de la altura de los vidrios, y se cubrió con butanol saturado en agua. Una vez hubo polimerizado esta fase, se retiró el butanol y se añadió la fase de compactación. Antes que esta polimerizase se colocó el peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras.

Una vez estuvo el gel preparado, se colocó en la cubeta de electroforesis, y se sumergió en tampón de recorrido (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), que se preparó a partir del mismo tampón concentrado x10.

Tras ser cargadas las muestras, se aplicó un voltaje de 50 V hasta que todas las muestras se alinearon en la fase de compactación. A partir de entonces se aplicó un voltaje de 120 V hasta el final de la electroforesis.

3.9.3.1. Marcadores de peso molecular

Se utilizó el marcador de peso molecular *Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Este marcador contiene una mezcla de proteínas con los siguientes pesos moleculares: 180, 130, 100, 70, 55, 45, 35, 25, 15 y 10 kDa. Estos pesos moleculares pueden variar dependiendo del lote al que pertenezca el tubo. Este marcador se presenta teñido comercialmente lo que facilita la visualización de sus respectivas bandas en experimentos de inmunodetección (*western blot*). Igualmente se utilizó este mismo marcador en los casos que los geles fuesen teñidos con azul de coomassie.

3.9.3.2. Tinción de geles de proteínas con Azul de Coomassie

La tinción se realizó incubando los geles de 30 minutos a 1 hora en la solución de tinción (0,5% Azul brillante de Coomassie R-250, 10% Ácido acético glacial, 25% Isopropanol) en agitación suave y a temperatura ambiente. A continuación se realizaron lavados con ácido acético glacial al 10% para eliminar el exceso de tinción y que sólo quedasen teñidas las proteínas presentes en el gel.

Se obtuvieron imágenes digitales de los geles con el equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS SYstem (Bio-Rad) utilizando el software Quantity One 4.6.6 (Bio-Rad).

3.9.4. Inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron transferidas a un soporte sólido para ser posteriormente detectadas mediante antiseros específicos.

3.9.4.1. Transferencia de proteínas a membranas por sistema semi-seco

Las proteínas separadas por electroforesis fueron electrotransferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. En el caso de las membranas de PVDF se realizó un pre-tratamiento con metanol por 10 minutos para posibilitar la transferencia. Esto es debido a hidrofobicidad de estas membranas, lo que requiere un tratamiento con solventes orgánicos para anular las cargas de las mismas. Tanto el gel como las membranas se equilibraron en tampón de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% Metanol, 1,3 mM SDS) antes de realizar la transferencia.

El gel de poliacrilamida se depositó encima de la membrana, y el conjunto se situó entre seis piezas de papel de transferencia, tres encima y tres debajo (Whatman 3mm) mojadas en tampón de transferencia. Este bloque se colocó entre el cátodo y el ánodo del aparato y se procedió a la transferencia de las proteínas con el equipo Trans-Blot SD-Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), aplicando un voltaje de 15 V durante 30 minutos.

3.9.4.2. Inmunodetección y revelado quimioluminiscente por el sistema ECLTM

Tras la transferencia, las membranas de nitrocelulosa o PVDF se bloquearon durante una hora en PBS-Tritón (Na_2HPO_4 80 mM, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 100 mM pH 7,3, Tritón X-100 0,2%) a temperatura ambiente con un agente de bloqueo, en nuestro caso leche descremada en polvo al 5%.

A continuación se descartó la solución de bloqueo y se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo primario contra la proteína que se quería detectar, diluido en 10 ml de tampón PBS-Tritón pero con leche descremada al 2 %. Posteriormente, se eliminó el exceso de anticuerpo con tres lavados en PBS-Tritón de 10 minutos cada. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (en algunos casos anti-ratón y en otros anti-conejo) conjugados con peroxidasa, diluidos a una concentración de 1:2,500 y 1:10,000, respectivamente. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó con tres lavados de 10 minutos cada uno en tampón PBS-Tritón.

Para iniciar la reacción quimioluminiscente de revelado, se incubó la membrana durante 5 minutos en la solución de revelado siguiendo las recomendaciones del fabricante (ECL Western Blotting, GE Healthcare). La detección y cuantificación se

llevó a cabo con el equipo *Molecular Imager ChemiDoc XRS System* (Bio-Rad) y el software *Quantity One 4.6.6* (Bio-Rad).

3.9.5. Valoración de actividades enzimáticas

3.9.5.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa (Miller, 1992)

Se hicieron crecer los cultivos hasta la D.O._{600nm} escogida, y se cogieron alícuotas de 1 ml que se mantuvieron en hielo hasta el momento de la realización del ensayo enzimático, un máximo de 16 horas.

De cada una de las alícuotas recogidas, se cogieron 100 μ l a los que se añadieron 900 μ l de tampón Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoetanol).

A continuación se provocó el lisado de las células al añadir 25 μ l de SDS 0,1% y 50 μ l de cloroformo, agitándose vigorosamente durante 15 segundos en vórtex. Tras la ruptura celular, se atemperó la mezcla a 28°C durante 5 minutos. Para la determinación de la actividad β -galactosidasa, a cada muestra se le añadieron 200 μ l de ONPG (Sigma-Aldrich), preparado en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7, a una concentración de 4 mg/ml. Se incubó la muestra a 28°C hasta la aparición de un color amarillo con una D.O._{420nm} entre 0,3 y 0,9, momento en que se detuvo la reacción con la adición de 0,5 ml de 1M Na₂CO₃. Se dejaron reposar las muestras unos minutos en la oscuridad, y se midieron las absorbancias a las longitudes de onda de 420 y 550 nm.

Una vez obtenidos todos los valores se calculó la actividad β -galactosidasa del cultivo en cuestión mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (U.M.)} = 1000 \times (\text{D.O.}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{D.O.}_{550\text{nm}})$$

$$T \times V \times \text{D.O.}_{600\text{nm}}$$

U.M.: Unidades Miller

D.O._{420nm} y D.O._{550nm}: absorbancias de la muestra a las longitudes de onda de 420 y 550 nm una vez detenida la reacción.

D.O._{600nm}: absorbancia del cultivo a 600 nm en el momento que se tomó la muestra.

T: tiempo transcurrido desde que se añadió el ONPG hasta que se detuvo la reacción (minutos).

V: volumen de muestra utilizado para determinar la actividad (ml).

3.10. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN CELULAR

Para determinar la capacidad de agregación celular en cultivos en fase estacionaria, se crecieron los cultivos de las cepas de interés en LB a 25 °C o 37 °C en agitación hasta una D.O._{600nm} de 2,0. Se transfirieron 10 ml de estas suspensiones a un tubo de ensayo. Se agitaron los tubos y se cogieron 100 µl del cultivo a 1 cm de la superficie de la suspensión, siendo esta primera muestra la correspondiente al tiempo 0. Manteniendo los tubos en estático se determina la D.O._{600nm} de muestras a lo largo del tiempo tomadas igualmente a 1 cm de la superficie de la suspensión. Los resultados se muestran como la disminución de la D.O._{600nm} inicial a lo largo del tiempo.

3.11. ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE BIOFILMS

Para determinar la capacidad de formación de biofilms de los distintos mutantes de la cepa de *E. coli* EAEC O42, se utilizó el protocolo descrito por (Sheikh *et al.*, 2001). Estos autores describen la formación de biofilms de esta cepa en distintos medios y establecen como medio estándar DMEM suplementado con 0,45% de glucosa. Se crecieron los cultivos de las cepas de interés en LB a 25°C o 37°C en agitación hasta una D.O._{600nm} de 2,0. Dependiendo de la placa de cultivo celular (Nunc) utilizada, es decir, de 96 pocillos o 24 pocillos, se inoculó distintas cantidades de la suspensión bacteriana y del medio de cultivo de acuerdo con la tabla a continuación.

Tabla 3.4. Condiciones utilizadas en los ensayos de biofilm realizados en este trabajo.

Medio de cultivo DMEM/glucosa 0,45% (µl/pocillo)	Placas de cultivo celular	µl de suspensión bacteriana a D.O._{600nm} de 2,0	Temperatura
200 µl	Placas de 96 pocillos	2 µl	25°C o 37°C
800 µl	Placas de 24 pocillos	8 µl	25°C o 37°C

Pasado el tiempo de incubación, los biofilms fueron revelados de acuerdo con el protocolo descrito a continuación. Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo con ayuda de una pipeta automática, teniendo cuidado de no tocar en la monocapa formada por las bacterias. Se lavó dos veces cada pocillo, en el caso de 24, con 1 ml de PBS (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl pH 7,3), y con 200 μl de PBS por pocillo en el caso de la placa de 96 pocillos. A continuación, se tiñó la monocapa de bacterias añadiendo 100 μl de una solución de cristal violeta 0,5% en los pocillos de 24 y la mitad de este volumen en los pocillos de 96. Pasados 5 minutos a temperatura ambiente, se retiró el colorante y se lavaron las placas con agua destilada. Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente. La cuantificación de los biofilms en las placas de 96 pocillos se realizó mediante la determinación de la D.O. a 570nm. Para ello, se añadió a cada pocillo 200 μl de etanol 95% y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Pasados estos minutos se resuspendió cada pocillo con ayuda de una pipeta automática y se transfirieron 150 μl de cada pocillo a un otro pocillo de una placa nueva. La lectura de la D.O._{570nm} se realizó en el lector de placas UVM340 (Biochrom Asys).

4. RESULTADOS

4.1. REGULACIÓN AMBIENTAL DEL REGULADOR DE LA ISLA DE PATOGENICIDAD I DE *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SV5015, EL GEN *hilA*

El primer objetivo de este trabajo fue establecer un modelo de regulación del gen *hilA* de *Salmonella* por las proteínas H-NS y Hha, para intentar posteriormente extrapolar este modelo a los reguladores de tipo HilA de la cepa 042 de *E. coli*. Con la finalidad de corroborar y, en su caso, extender los resultados obtenidos por otros autores sobre la regulación del gen *hilA* por las proteínas asociadas a la cromatina H-NS y Hha, decidimos en primer lugar estudiar el efecto de diferentes condiciones ambientales sobre la expresión de *hilA*.

4.1.1. Construcción de una fusión transcripcional plasmídica *hilA::lacZ*

En la primera parte de este trabajo se decidió utilizar una fusión plasmídica *hilA::lacZ* para los estudios de regulación transcripcional. Primeramente se realizó una búsqueda de la secuencia del promotor del gen *hilA* (P_{hilA}) en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se obtuvo la secuencia del gen *hilA* de la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 y con la misma se realizó una búsqueda en el genoma de la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344, secuenciada por el Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/salmonella.html>). Una vez obtenida la secuencia del P_{hilA} de esta cepa, se utilizó la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) la cual nos confirmó una homología de 99% en secuencia nucleotídica entre las dos cepas. Una vez determinada la secuencia promotora del gen *hilA* de la cepa SL1344 se obtuvieron oligonucleótidos específicos para amplificar distintas regiones de su promotor (Fig. 4.1). Los oligonucleótidos llevaban dianas para los enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Para llevar a cabo los estudios transcripcionales se utilizó el plásmido de bajo número de copias pFZY1 (Koop *et al.*, 1987), el cual permite fusionar un gen promotor a los genes *lacZYA* encontrados aguas abajo del sitio múltiple de clonaje. Se amplificaron por PCR dos fragmentos de ADN correspondientes al promotor del gen *hilA* utilizando los oligonucleótidos HILAECO5/HILABAM23, generando un

fragmento de ADN de 877 nucleótidos y los oligonucleótidos HILAECO5/HILABAM3 generando en este caso un fragmento de ADN de 505 nucleótidos. Una vez tratado con los enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* el ADN fue ligado al vector pFZY1, previamente digerido con los mismos enzimas y desfosforilado. De la ligación resultante se transformó la mitad del volumen a la cepa AAG1 de *E. coli* (variante *lac* de la cepa MG1655. Ver tabla 3.1). De las colonias resistentes al marcador del plásmido (ampicilina 25 µg/ml), cinco fueron comprobadas mediante PCR confirmatoria y posteriormente dos clones fueron secuenciados utilizando la pareja de oligonucleótidos HILAECO5 y PFZY1REV. De los plásmidos secuenciados, se escogió uno de cada construcción y fueron denominados pHILA877 y pHILA505, respectivamente (Fig. 4.1).

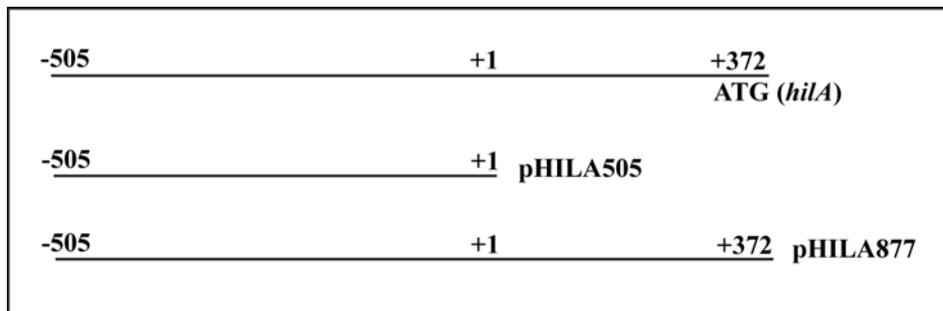


Figura. 4.1. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales construidas con diferentes fragmentos de la región promotora del operón *hilA* de la cepa SL1344. Como referencia se toma el inicio de transcripción (+1), desde el nucleótido -505 (aguas arriba del +1) hasta el nucleótido +372 (aguas abajo del +1).

4.1.2. Estudios de la regulación del gen *hilA* utilizando los plásmidos pHILA505 y pHILA877 en la cepa de *E. coli* AAG1

Primeramente se realizó un estudio transcripcional de las fusiones *hilA::lacZ* contenidas en los plásmidos pHILA505 y pHILA877 en la cepa de *E. coli* AAG1 en medio LB. Para este estudio se hicieron crecer las cepas AAG1 (pHILA505) y AAG1 (pHILA877) en medio líquido LB en presencia del antibiótico ampicilina a una concentración final de 25 µg/ml. Los cultivos fueron incubados a 25°C o a 37°C en agitación constante de 200 rpm. Se tomaron muestras de los cultivos a valores de D.O.₆₀₀ de 0,4 y 2,0, lo que correspondería a fase exponencial y comienzo de fase

estacionaria del crecimiento bacteriano. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de β -galactosidasa de acuerdo con el apartado 3.9.5.1 de materiales y métodos.

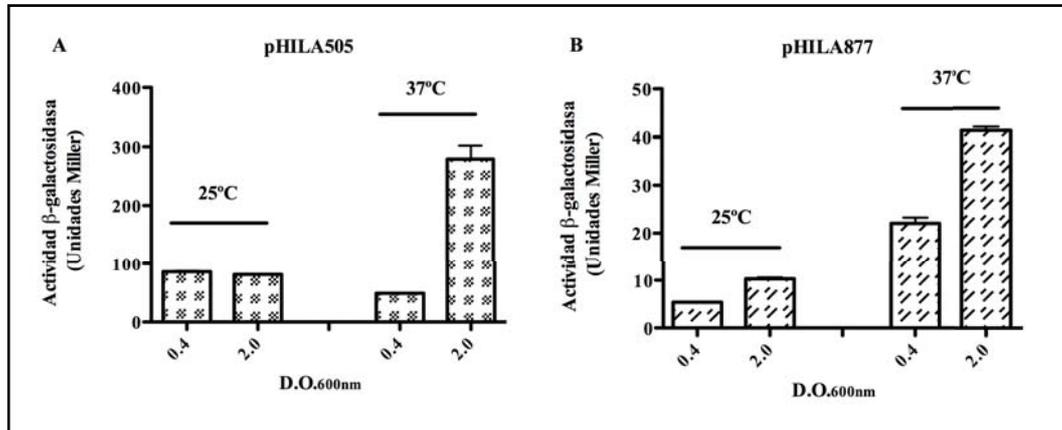


Figura 4.2. Efecto de la temperatura en la expresión de *hilA* en la cepa AAG1 conteniendo respectivamente los plásmidos pHILA505 y pHILA877. Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado de las cepa AAG1 con los plásmidos pHILA505 (A) y con el plásmido pHILA877 (B). Nótese que las escalas entre los dos gráficos no son comparables.

Dado que *hilA* se encuentra sometido al control de un gran número de reguladores (Ellermeier & Slauch, 2007) y además responde a condiciones ambientales (Bajaj *et al.*, 1996; Lawhon *et al.*, 2002) se esperaba encontrar un comportamiento parecido con las dos fusiones transcripcionales utilizadas. Como se desprende de la figura 4.2, los valores de expresión encontrados en las dos distintas construcciones con el operón del gen *hilA* se distinguen en un orden de aproximadamente 10 veces. Una posible explicación para estos elevados valores de actividad β -galactosidasa sería la ausencia de la región UTR (*Untranslated Region*) de la región promotora de *hilA* no incluida en la construcción del plásmido pHILA505, (Fig. 4.1). Un trabajo anterior Olekhovich & Kadner, 2006 describió posibles cajas de unión de la proteína H-NS en esta secuencia UTR así como en la región más aguas arriba de *PhlA*, lo que explicaría los valores de actividad β -galactosidasa encontrados en este estudio con el plásmido pHILA505. La ausencia de tal región nos indicó que la secuencia UTR de este operón posee un importante papel en la regulación por temperatura ya que cuando la misma está presente responde de manera regulada a misma (Fig. 4.2B). Teniendo en cuenta

que estos experimentos fueron realizados en *E. coli* y para descartar cualquier artefacto especie-dependiente, decidimos continuar nuestro estudio exclusivamente con el plásmido pHILA877 en la cepa SV5015 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

4.1.3. Regulación de la expresión del gen *hila* mediante la fusión *hila::lacZ* clonada en el plásmido pHILA877 en la cepa SV5015 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

A continuación procedimos a estudiar la expresión del plásmido pHILA877 en la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SV5015. Para ello primeramente el plásmido fue transformado en la cepa LB5000 de *S. Typhimurium*, la cual es deficiente del sistema de restricción de ADN pero con el sistema de modificación de ADN intacto (Bullas & Ryu, 1983). Esto nos permitió obtener el plásmido pHILA877 metilado por la cepa LB5000 para luego transformarlo a la cepa SV5015. A continuación se hizo crecer la cepa SV5015 (pHILA877) en medio líquido LB en presencia del antibiótico ampicilina a una concentración final de 25 µg/ml. Los cultivos fueron incubados a 25°C o a 37°C en agitación constante de 200 rpm. Se tomaron muestras de los cultivos a D.O._{600nm} de 0,4 y 2,0, lo que correspondería a fase exponencial y comienzo de fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de β-galactosidasa de acuerdo con el apartado 3.9.5.1 de materiales y métodos.

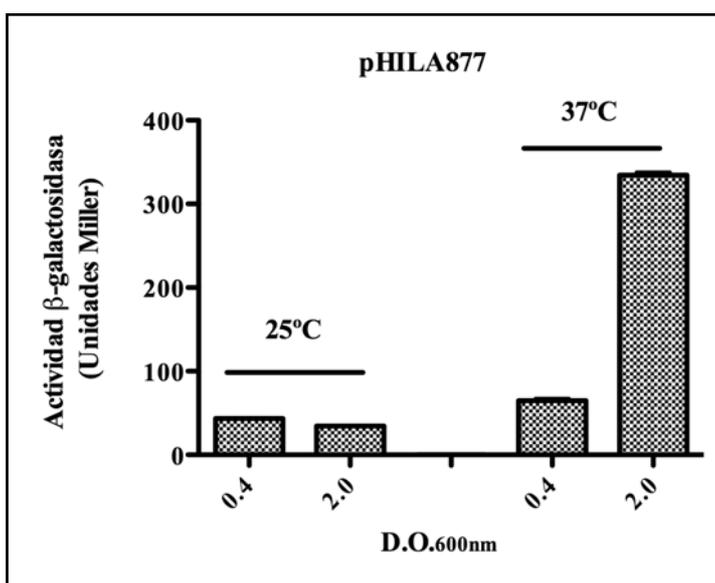


Figura 4.3. Efecto de la temperatura en la expresión del gen *hila* del plásmido pHILA877. Resumen de los valores de actividad β-galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado de la cepa SV5015 (pHILA877).

Tal y como es posible observar en la figura 4.3 existe un comportamiento distinto en la expresión del operón *hilA* clonado en el plasmido pHILA877 a las dos temperaturas utilizadas. A 25°C, lo que simularía condiciones ambientales, existe poca expresión de *hilA*, lo que indica que este gen se encuentra reprimido a bajas temperaturas. A 37°C, lo que simularía condiciones encontradas en el hospedador, se observa un comportamiento distinto dependiente de la fase de crecimiento. Claramente la expresión máxima de *hilA* se obtiene en fase estacionaria del crecimiento bacteriano ($D.O._{600nm} = 2,0$). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Song y colaboradores (Song *et al.*, 2004) donde establecen la expresión de *hilA* en fase estacionaria dependiente de la alarmona ppGpp. La represión dependiente de temperatura de *hilA* ya había sido reportada por Olekhnovich y Kadner (Olekhnovich & Kadner, 2006), pero la misma no se había asociado a la fase de crecimiento.

4.1.4. Uso de una fusión cromosómica *hilA::lacZ* en la cepa SV5015 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium para estudiar la regulación del gen *hilA*

El hecho de que, por una parte, los plásmidos pHILA505 y pHILA877 se comportasen de forma diferente en *E. coli*, y que la fusión *hilA::lacZ* en *Salmonella* se expresase de forma diferencial en función de la fase de crecimiento podría también interpretarse considerando que el número de copias de los mismos podía variar en función del hospedador o de la propia fase de crecimiento. Por ello decidimos continuar los estudios de regulación de *hilA* utilizando una fusión transcripcional *hilA::lacZ* localizada en el cromosoma de la cepa SV5015. Esta fusión fue construida de acuerdo con el apartado 3.8.5 de materiales y métodos.

4.1.4.1. Regulación ambiental de la fusión *hilA::lacZ* en la cepa SV5015

Los resultados obtenidos con las fusiones plasmídicas *hilA::lacZ* sugerían que este gen se encuentra reprimido a baja temperatura. Tal y como se ha referido anteriormente, se sabía de antemano que la expresión de *hilA* se encuentra reprimida a baja temperatura y también a baja osmolaridad (Ono *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2003). Asimismo, otros autores habían puesto de manifiesto que la expresión de *hilA* es dependiente de la fase de crecimiento alcanzando los niveles máximos de expresión cuando las células se encuentran en fase estacionaria crecidas en medio LB (Song *et al.*,

2004). Por todo ello, una vez obtenida una fusión cromosómica *hilA::lacZ* decidimos utilizar la misma para asociar la regulación de *hilA* por temperatura y osmolaridad con la fase de crecimiento.

La expresión de *hilA* fue determinada en la cepa SV5015UB2 (SV5015 *hilA::lacZ*) crecida en medio LB a 25°C y 37°C. En paralelo, se realizaron los mismos estudios sustituyendo el medio LB por medio LB 0M NaCl (condiciones de baja osmolaridad). Todos los cultivos fueron incubados a 25°C o a 37°C en agitación constante de 200 rpm. Se tomaron muestras de los cultivos a D.O._{600nm} de 0,4 y 2,0. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de β-galactosidasa de acuerdo con el apartado 3.9.5.1.

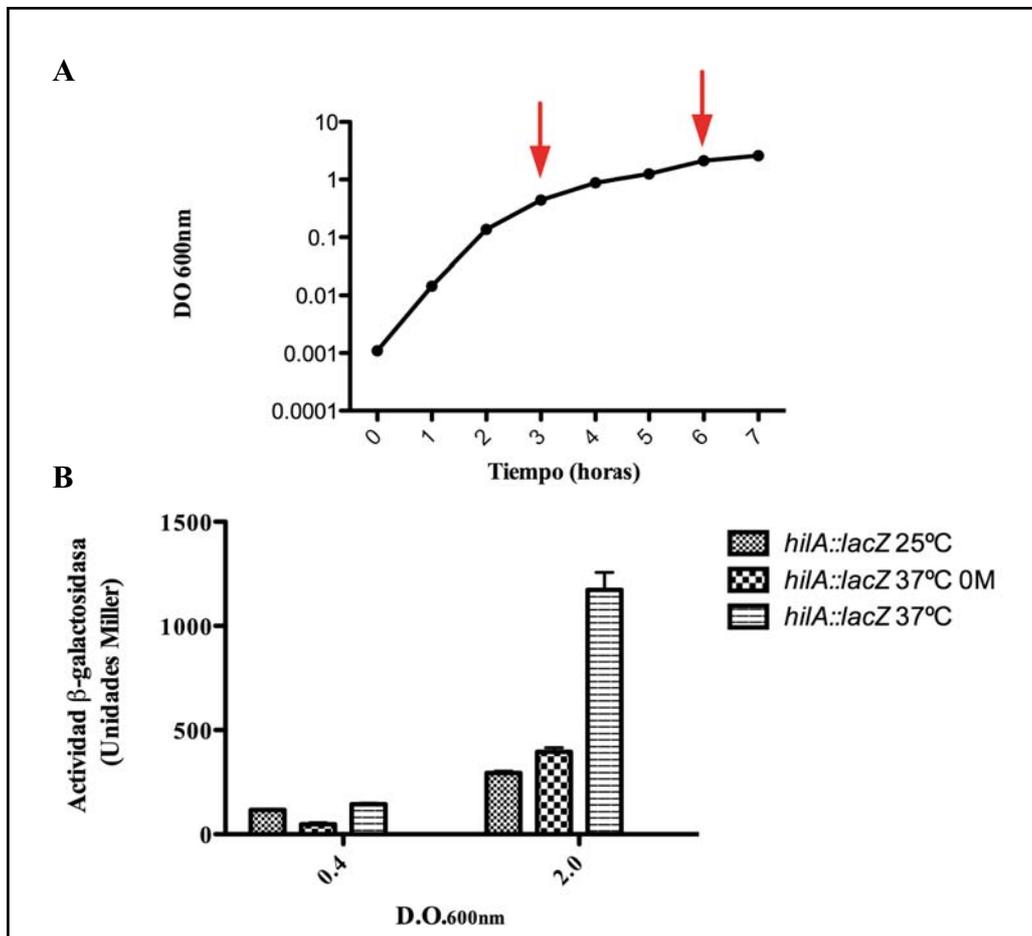


Figura 4.4. Efecto regulador de la temperatura, osmolaridad y fase de crecimiento en la expresión de *hilA* en la cepa SV5015UB2. A) Curva de crecimiento de la cepa SV5015UB2 en medio LB a 37°C. Las flechas indican la D.O.₆₀₀ correspondientes a 0,4 (3 horas de cultivo) y 2,0 (6 horas de cultivo). B) Resumen de los valores de actividad β-galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Los resultados obtenidos (Fig. 4.4) claramente muestran que, tal y como se esperaba, la expresión de *hilA* se encuentra reprimida a baja temperatura y baja osmolaridad. Es importante resaltar que a 37°C en medio LB se observa una importante inducción en la expresión de *hilA* dependiente de la fase de crecimiento. Si bien a 37°C en fase exponencial se produce una moderada inducción de *hilA* respecto a los cultivos a baja temperatura o a baja osmolaridad, la inducción de *hilA* a elevada temperatura es fuertemente dependiente de la fase de crecimiento. Este efecto, pero de menor escala, también se observó cuando se utilizó la fusión *hilA::lacZ* en el plásmido pHILA877 (apartado 4.1.3.1.). Por tanto, en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, la expresión del gen *hilA* en la cepa SV5015 se encuentra reprimida en condiciones de baja temperatura y osmolaridad. En condiciones de osmolaridad media (medio LB) y a una temperatura de 37°C, la expresión de *hilA* sufre una fuerte inducción cuando las células entran en la fase estacionaria.

4.1.4.2. Regulación por temperatura y osmolaridad del gen *hilA* por las proteínas asociadas al nucleóide H-NS y Hha

En la familia *Enterobacteriaceae*, las proteínas H-NS y Hha están involucradas en la regulación por temperatura y osmolaridad de diferentes genes (Forns *et al.*, 2005b; Madrid *et al.*, 2002a; 2007). Asimismo, ambas se habían asociado a la regulación de *hilA* (Olekhovich & Kadner, 2006). Como continuación a nuestros estudios, decidimos determinar el papel de estas dos proteínas en la regulación de *hilA* por temperatura, osmolaridad y fase del crecimiento bacteriano. Como paso previo, se realizaron las correspondientes construcciones genéticas. La fusión *hilA::lacZ* fue transducida a los correspondientes mutantes *hha*, *hns* y doble mutante *hha hns* de la cepa SV5015 de acuerdo con el apartado 3.7.4.3 de materiales y métodos. A continuación se hicieron crecer las cepas SV5015UB2 (*hilA::lacZ*), SV5015UB2H (*hilA::lacZ* Δ *hha*), SV5015UB2AV1 (*hilA::lacZ* Δ *hns*) y SV5015UB2HAV1 (*hilA::lacZ* Δ *hha*, Δ *hns*) a 25°C en medio LB, y a 37°C en medio LB 0M de NaCl y en LB. Los cultivos fueron incubados en agitación constante de 200 rpm. Se tomaron muestras de los cultivos a D.O._{600nm} de 0,4 y 2,0. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de β -galactosidasa de acuerdo con el apartado 3.9.5.1 de materiales y métodos. En la figura 4.5 se reseñan los resultados obtenidos.

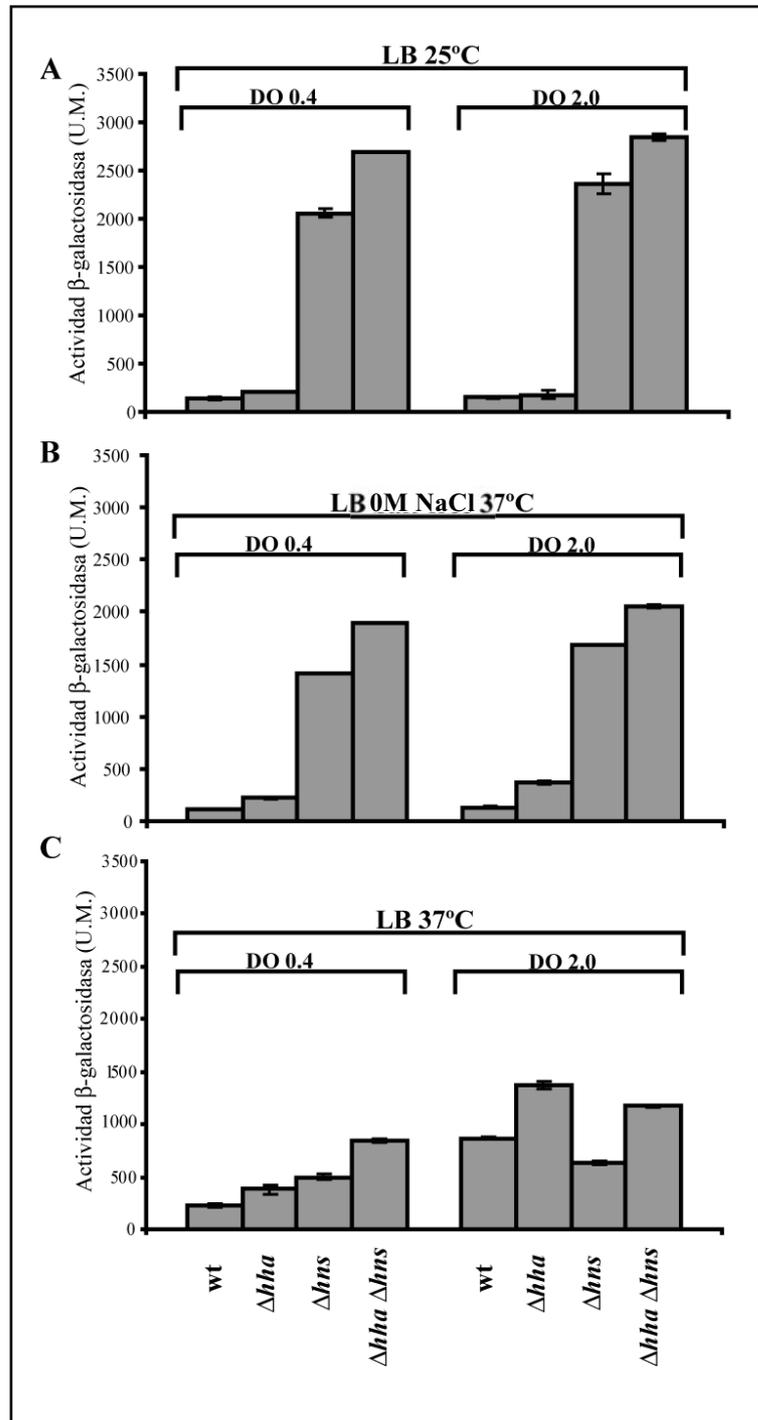


Figura 4.5. Efecto de las mutaciones Δhha y Δhns en la regulación por temperatura y osmolaridad de *hila::lacZ* en la cepa SV5015UB2. A) Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB a 25°C. B) Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado de cultivos crecidos a 37°C en medio LB 0M de NaCl. C) Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado de cultivos crecidos a 37°C en medio LB. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Con respecto al crecimiento a temperatura ambiente, es decir, a 25°C (Fig. 4.5A) y a baja osmolaridad (Fig. 4.5B) el efecto de las mutaciones en los alelos *hns*, *hha* y *hns hha* en la expresión de *hilA* nos indicó claramente que H-NS juega el papel predominante en el silenciamiento dependiente de temperatura o de osmolaridad. Tal y como se puede comprobar, este silenciamiento es independiente de la fase de crecimiento bacteriano en ambos casos. El hecho de que el doble mutante *hha hns* presentase los mayores valores de expresión de β -galactosidasa en los ensayos de baja temperatura y osmolaridad nos indica que Hha incrementa el silenciamiento dado por parte de H-NS en la expresión de *hilA*.

Con respecto al crecimiento a 37°C en medio LB, en fase exponencial del crecimiento bacteriano los resultados obtenidos evidencian que tanto H-NS como Hha reprimen moderadamente la expresión de *hilA* y (en función de los resultados obtenidos con el doble mutante analizado en estas condiciones) existe un efecto sinérgico de ambas proteínas (Fig. 4.5.C). De forma destacable, en fase estacionaria del crecimiento bacteriano, H-NS deja de reprimir *hilA*, lo cual podría asociarse a la inducción en fase estacionaria de este gen que se observa en la cepa salvaje. Con respecto a la proteína Hha, se observa un modesto efecto represor por parte de la misma (incremento de 1.5 veces en el mutante *hha* con respecto a la cepa salvaje). Resultados previamente publicados (Olekhnovich & Kadner, 2006) ya reportaron este comportamiento, pero no lo explicaron. A fin de explicarlo, como hipótesis de trabajo consideramos que teniendo en cuenta que en un mutante *hns* los niveles de Hha se encuentran aumentados (Hommals *et al.*, 2001), una posible explicación sería que el exceso de la proteína Hha en un fondo genético Δhns pudiera estar reprimiendo de forma artefactual la transcripción de *hilA*. Para apoyar esta hipótesis, decidimos sobreexpresar Hha en *trans* transformando la cepa SV5015UB2 con el plásmido pUBM22 el cual expresa Hha constitutivamente (Nieto *et al.*, 1991). La transcripción de la fusión *hilA::lacZ* en presencia del plásmido pUBM22, fue cuantificada en fase exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano utilizando el ensayo de β -galactosidasa. La sobreexpresión de Hha por parte del plásmido pUBM22 resultó en una reducción de la actividad β -galactosidasa (Fig. 4.6).

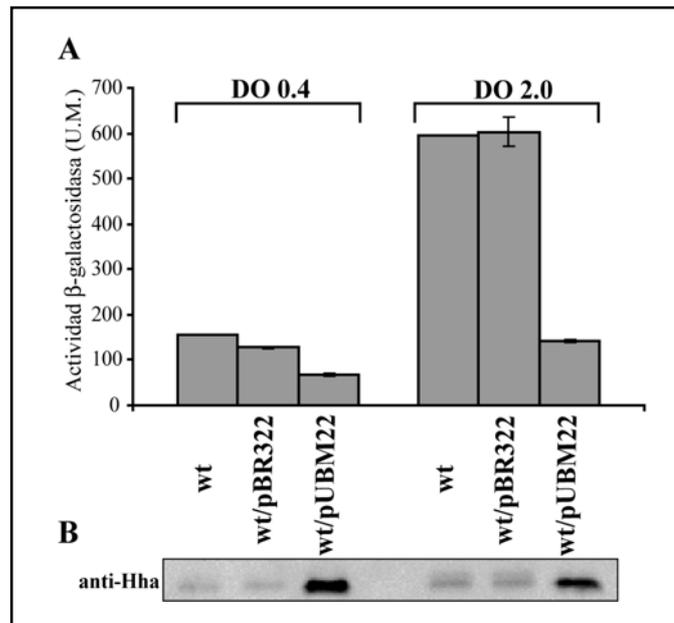


Figura 4.6. La sobreexpresión de Hha por parte del plásmido pUBM22 reprime la transcripción de la fusión *hila::lacZ* en células crecidas en LB a 37°C. A) Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB a 37°C de las cepas SV5015UB2, SV5015UB2 (pBR322) y SV5015UB2 (pUBM22). Se muestra la derivación estándar de las medidas. B) Inmunodetección de la proteína Hha en los extractos correspondientes utilizando un anticuerpo específico contra la misma (Balsalobre *et al.*, 1996).

Estos resultados ponen de manifiesto una actividad moduladora de Hha independiente de H-NS. Teniendo en cuenta que la actividad represora de Hha se ha asociado a H-NS, decidimos comprobar si, en ausencia de H-NS, la proteína Hha podría interactuar con el parálogo de H-NS, la proteína StpA. Para esto se llevaron a cabo la traducción de las mutaciones *hila::lacZ* y *hha::Cm* a la cepa portadora de la mutación Δ *stpA* (SV5015S), generando la cepa SV5015UB2HS. El protocolo de transducción utilizado se detalla en el apartado 3.7.4.3 de materiales y métodos. La transcripción de la fusión *hila::lacZ* fue cuantificada en la cepa SV5015UB2HS a partir de cultivos crecidos en medio LB a 37°C utilizando el ensayo de β -galactosidasa. Para ello se tomaron muestras del cultivo en fase exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano y se procedió la evaluación de la expresión de *hila::lacZ*. Los resultados obtenidos indicaron que no existe un efecto sinérgico de ambas mutaciones en la expresión de *hila*, es decir, la proteína Hha, en este caso, no estaría regulando la expresión de *hila* a través de la interacción con la proteína StpA (resultados no presentados).

Se ha descrito y caracterizado previamente que condiciones de alta y baja temperatura, (37°C y 25°C respectivamente), y también la osmolaridad del medio condicionan el silenciamiento de genes por parte de H-NS (Falconi *et al.*, 1998, Madrid *et al.*, 2007, Ono *et al.*, 2005). En este trabajo comprobamos que tanto la temperatura como la osmolaridad modifican la capacidad de H-NS en silenciar la transcripción de *hilA*. La combinación de estos factores (elevada temperatura y elevada osmolaridad) reduce la capacidad de H-NS de reprimir *hilA*. Estos resultados sugieren una posible influencia de factores físico-químicos tales como la temperatura y/o osmolaridad bien sobre el ADN o bien sobre la propia proteína H-NS, reduciendo así su capacidad de reprimir la expresión de *hilA*. No obstante, la completa desrepresión por parte de H-NS en la transcripción de *hilA* requiere que las células se encuentren además en fase estacionaria. Este dato nos sugirió la posible existencia de otro factor, además de temperatura y osmolaridad, que interfiriese con la represión de *hilA* por H-NS en fase estacionaria. Además de factores físico-químicos, es bien conocida la existencia de proteínas reguladoras que interfieren con la represión de H-NS en un notable número de genes (Dillon & Dorman, 2010), (ver apartado 1.4.3.1.).

4.1.4.3. La inducción de *hilA* en fase estacionaria requiere la proteína IHF

Considerando posibles proteínas con actividad anti-H-NS como candidatos a interferir con la represión de *hilA* por H-NS, planteamos en primer lugar la proteína IHF. Se sabe de antemano que esta proteína juega un importante papel en la expresión de genes requeridos por *S. Typhimurium* para someterse a los cambios fisiológicos asociados a transición de fase de crecimiento celular y también para activación de genes de virulencia (Mangan *et al.*, 2006). Entre los genes afectados se destacan el mismo *hilA* y varios genes de la SPI1 de *Salmonella* que poseen su expresión reprimida en los mutantes *ihfA* y *ihfB* en la cepa de *S. Typhimurium* SL1344 (Mangan *et al.*, 2006). Por otra parte, tal y como se ha referido en el apartado 1.7.2.1 de la introducción de esta tesis, es bien conocido que las proteínas HilD, HilC y RtsA son requeridas para la correcta expresión de *hilA* en fase estacionaria en células crecidas en medio LB a 37°C (Boddicker *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2005; Lucas & Lee, 2001). Por lo tanto, consideramos las hipótesis de que bien la cascada reguladora constituida por estas tres proteínas o bien la proteína IHF podría estar antagonizando el silenciamiento dado por parte de la proteína H-NS en la transcripción de *hilA*. Si este planteamiento es correcto,

la mutación en el hipotético antagonista bloquearía la inducción de *hilA* en fase estacionaria, pero la misma se restauraría si se combinara con una mutación en el gen *hns* (ver Fig. 4.7).

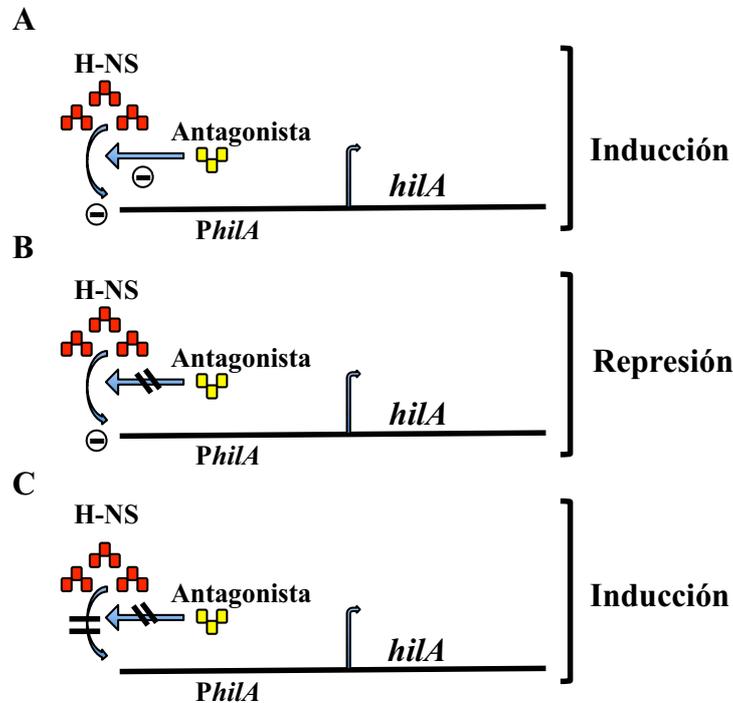


Figura 4.7. Efecto de las mutaciones en el hipotético antagonista y en el gen *hns* sobre la expresión de *hilA* en fase estacionaria. A) En presencia de la proteína H-NS y de la proteína antagonista, esta última es capaz de interferir sobre el efecto represor de H-NS, lo que resulta en la inducción de *hilA*. B) En ausencia de la proteína antagonista, H-NS reprime *hilA*. C) En ausencia de ambas proteínas tiene lugar la inducción de *hilA* en fase estacionaria.

Para determinar si alguna de estas hipótesis es correcta, intentamos combinar la mutación *hns* con las mutaciones *hilD*, *hilC* e *ihf* en la cepa SV5015UB2. La combinación de la mutación *hns* con los alelos *hilC* y *hilD* fue conseguida con éxito. Sin embargo, la combinación de la mutación *hns* con los alelos *ihfA* y *ihfB* parece ser inviable en la cepa SV5015. Como alternativa a este problema decidimos interferir parcialmente con la actividad represora de H-NS en la transcripción de *hilA*, expresando en *trans* la proteína H-NST_{EPEC} bien en mutantes *ihfA* o *ihfB*. Esta proteína corresponde a una forma truncada de la proteína H-NS encontrada de manera natural en cepas enteropatógenicas de *E. coli* y posee una actividad anti-H-NS, es decir, es capaz de

antagonizar la actividad de H-NS (Williamson & Free, 2005). Basado en esto, se esperaría observar un aumento en la transcripción de *hilA* en los mutantes *hilC*, *hilD* o *ihf* cuando la actividad H-NS fuera reducida por la expresión de la proteína H-NST_{EPEC}. Así sería únicamente si HilC, HilD o IHF actuaran como antagonistas del silenciamiento dado por parte de H-NS en la transcripción de *hilA*. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión transcripcional de *hilA::lacZ* en cultivos en fase estacionaria (D.O.₆₀₀ = 2,0) de derivados de la cepa SV5015UB2 con las mutaciones *hilD* (cepa SV5015UB2D) y *hilC hilD* (SV5015UB2CD) o en presencia de la proteína H-NST_{EPEC} codificada en *trans* por el plásmido pBADHNS_t, inducible por L-arabinosa. El efecto de la expresión de la proteína H-NST_{EPEC} en la expresión de *hilA* fue cuantificado en células crecidas en medio LB o LB suplementado con L-arabinosa al 0,02% a 37°C y los resultados se presentan en la tabla 4.1. El efecto antagonista de la proteína H-NST_{EPEC} sobre la proteína H-NS en los mutantes *hilD* o en el doble mutante *hilC hilD* no resultó en la restauración de la inducción de *hilA* en fase estacionaria en dichas cepas. Estos resultados obtenidos están de acuerdo con los encontrados previamente para cepa de *S. Typhimurium* LT2 (Olekhovich & Kadner, 2006).

Cepa	Actividad β-galactosidasa (U.M)*		Expresión relativa†	
	LB	LB	LB	LB
		L-Ara 0.02%		L-Ara 0.02%
WT <i>hilA::lacZ</i>	1191	1059	1	1
WT <i>hilA::lacZ</i> pBAD18	1155	1163	0,97	1,1
<i>hilA::lacZ</i> Δ <i>hilD</i> ::Cm pBADHNS _t	150,2	153	0,13	0,14
<i>hilA::lacZ</i> Δ <i>hilC</i> Δ <i>hilD</i> ::Cm pBADHNS _t	154,4	132,4	0,13	0,12

Tabla 4.1A. Efecto de la expresión de la proteína H-NST_{EPEC} del plásmido pBADHNS_t sobre la transcripción de *hilA::lacZ* en las cepas portadoras de las mutaciones *hilD* y *hilC*. *Resumen de los valores de actividad β-galactosidasa (Unidades Miller; U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB a 37°C o LB suplementado con 0,02% de L-Arabinosa. †La expresión relativa fue calculada a través de la división del valor de β-galactosidasa obtenido de las cepas con el correspondiente plásmido (pBAD18 o pBADHNS_t) por el valor obtenido de la cepa parental salvaje (*hilA::lacZ*).

A continuación se llevó a cabo la comprobación del posible papel antagonista de la proteína IHF en la activación de *hilA* en fase estacionaria. En primer lugar, utilizando el programa bioinformático *Virtual Footprinting* (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>) (Münch *et al.*, 2005) se localizó una probable secuencia de unión a la proteína IHF en la región promotora del gen *hilA* (Fig. 4.8A). Posteriormente se llevó a cabo la combinación de las mutaciones *ihfA* y *ihfB* en la cepa SV5015UB2 generando así las cepas SV5015UB2IHFA y SV5015UB2IHFB, respectivamente. A continuación se realizó la cuantificación de la actividad β -galactosidasa en las cepas SV5015UB2IHFA y SV5015UB2IHFB crecidas en medio LB a 37°C en fase exponencial y estacionaria del crecimiento (Fig. 4.8B).

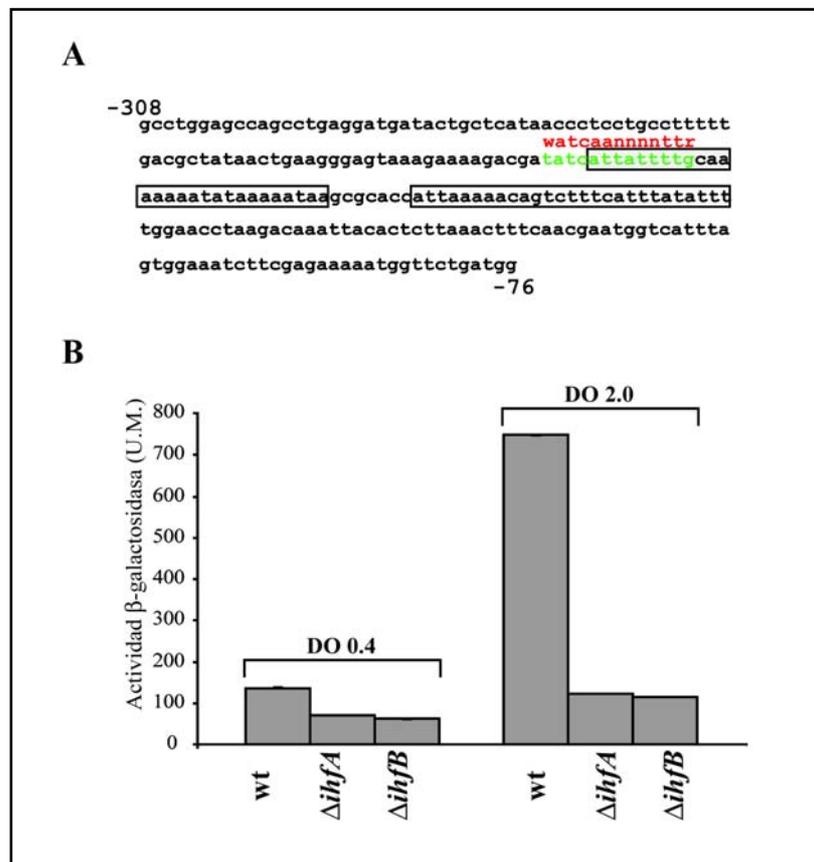


Figura 4.8. Efecto de las mutaciones *ihfA* y *ihfB* en la inducción de *hilA* en fase estacionaria en la cepa SV5015. A) Ilustración esquemática de la secuencia parcial de la región promotora de *hilA*. Los números corresponden a distancia del inicio de transcripción. Las secuencias destacadas por los rectángulos en negro corresponden a cajas de unión reconocidas por la proteína H-NS (Olekhnovich & Kadner, 2006). Los nucleótidos destacados en verde corresponden al probable secuencia de unión a proteína IHF identificado por el programa

Virtual Footprinting. La secuencia destacada en rojo corresponde a secuencia consenso (Craig & Nash, 1984, Goodrich *et al.*, 1990) reconocida por la proteína IHF (WATCAANNNTTR, donde W es una adenina o tiamina, N puede ser cualquier uno de los cuatro nucleótidos y R es una adenina o guanina). B) Resumen de los valores de actividad β-galactosidasa (U.M.) de la fusión *hilA::lacZ* obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB a 37°C de las cepas SV5015UB2, SV5015UB2IHFA y SV5015UB2IHFB. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Como es posible observar en la figura 4.8B cuando las células fueron crecidas en medio LB a 37°C, en fase estacionaria, no se observó inducción de *hilA* en las cepas portadoras de la delección en los alelos *ihfA* y *ihfB*. En otras condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo, como baja temperatura y osmolaridad, no se observó en ninguno de los dos casos que las mutaciones en los alelos correspondientes a proteína IHF alterasen la expresión de *hilA* (datos no presentados). A continuación llevamos a cabo la cuantificación de la expresión de β-galactosidasa de las cepas portadoras de una fusión transcripcional *hilA::lacZ* en combinación con las mutaciones *ihfA* y *ihfB*, bajo la influencia de la proteína HNST_{EPEC} codificada por el plásmido pBADHNSt (Tabla 4.1B). La interferencia con la función H-NS resultó en un significativo incremento en la expresión de *hilA* tanto en el mutante *ihfA* como en el mutante *ihfB*, lo que representa la restauración del 50% en la expresión de *hilA::lacZ* cuando se compara con los valores obtenidos en la cepa salvaje (Tabla 4.1A). Los resultados obtenidos de estos ensayos *in vivo* nos sugirieron que en determinadas condiciones ambientales, como alta temperatura y osmolaridad y fase estacionaria del crecimiento, la presencia de IHF antagoniza el silenciamiento mediado por H-NS en la transcripción de *hilA*.

Cepa	Actividad β-galactosidasa (U.M)*		Expresión relativa†	
	LB	LB	LB	LB
		L-Ara 0.02%		L-Ara 0.02%
WT <i>hilA::lacZ</i>	1191	1059	1	1
WT <i>hilA::lacZ</i> pBAD18	1155	1163	0,97	1,1
<i>hilA::lacZ</i> Δ <i>ihfA</i> ::Cm pBADHNSt	295,9	611,7	0,25	0,58
<i>hilA::lacZ</i> Δ <i>ihfB</i> ::Cm pBADHNSt	301,1	508,8	0,25	0,48

Tabla 4.1B. Efecto de la expresión de la proteína H-NST_{EPEC} del plásmido pBADHNS_t sobre la transcripción de *hilA::lacZ* en las cepas portadoras de las mutaciones *ihfA*, *ihfB*. *Resumen de los valores de actividad β-galactosidasa (Unidades Miller; U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB a 37°C o LB suplementado con 0,02% de L-Arabinosa. †La expresión relativa fue calculada a través de la división del valor de β-galactosidasa obtenido de las cepas con el correspondiente plásmido (pBAD18 o pBADHNS_t) por el valor obtenido de la cepa parental salvaje (*hilA::lacZ*).

4.1.4.4. Las proteínas H-NS y IHF son capaces de unirse a región promotora de *hilA*

Para aportar nuevas evidencias experimentales de que IHF interfiere con el silenciamiento mediado por H-NS en la región reguladora de *hilA*, llevamos a cabo ensayos de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) competitivos entre las proteínas H-NS y IHF utilizando el ADN de la región promotora de *hilA* (apartado 3.5.8 de materiales y métodos). Para este ensayo se amplificó por PCR la región reguladora de *hilA* (nucleótidos -505 hasta +372) la cual posee tanto la secuencia de unión a proteína IHF, como también las secuencias de unión a proteína H-NS (Fig. 4.8A). Para este ensayo el ADN fue incubado con las mínimas concentraciones de ambas proteínas, H-NS y IHF, capaces de retardar la secuencia reguladora de *hilA* (1 ó 0,16 μM, respectivamente). Después de una incubación de 15 minutos a 37°C se añadieron concentraciones crecientes de la segunda proteína (H-NS o IHF) y se incubó 15 minutos más a 37°C. Como es posible visualizar en la figura 4.9, cuando H-NS fue incubada primeramente con el ADN, la presencia de concentraciones crecientes de IHF generó un patrón de migración del complejo ADN-proteínas tal como el generado por el complejo ADN-H-NS. Asimismo cuando IHF fue incubada primeramente con el ADN, la presencia de concentraciones crecientes de H-NS no alteró el patrón del complejo ADN-proteínas manteniéndose en el mismo patrón migratorio del complejo ADN-IHF. Estos resultados sugieren que IHF es capaz de unirse a complejos preexistentes H-NS/ADN. Por el contrario, si IHF se une a a dicho fragmento de ADN, H-NS no altera dicho complejo.

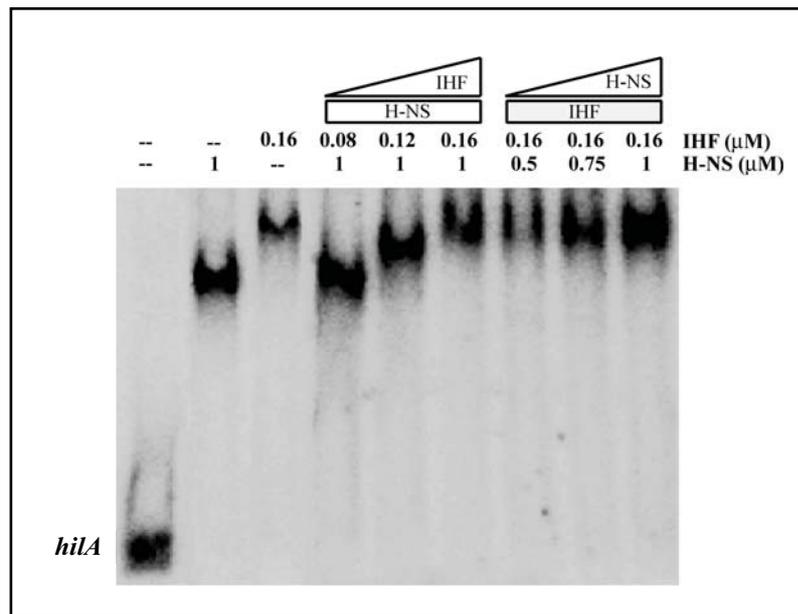


Figura 4.9. EMSA de competición entre las proteínas H-NS y IHF en la región reguladora de *hilA*. El ADN correspondiente al promotor de *hilA* fue incubado con las proteínas H-NS (1 μ M) e IHF (0,16 μ M) o con una mezcla de las dos proteínas en cantidades crecientes, H-NS (0,5 hasta 1 μ M) e IHF (0,08 hasta 0,16 μ M). El experimento de EMSA fue realizado a 37°C por triplicado y la figura presentada representa uno de los gels obtenidos.

4.1.4.5. IHF es capaz de antagonizar el efecto represor de H-NS en la transcripción de *hilA*

Los resultados obtenidos en los estudios transcripcionales de *hilA* en ensayos realizados *in vivo* y *in vitro*, nos indicaron que la proteína IHF parece tener un papel como regulador transcripcional de *hilA*. Para determinar el posible efecto de IHF en la transcripción de *hilA* en presencia de H-NS, hemos realizado ensayos de transcripción “*single round*” *in vitro* utilizando las proteínas H-NS y IHF juntamente con el promotor de *hilA* (apartado 3.6.4 de materiales y métodos). En primer lugar, los resultados obtenidos nos indicaron que concentraciones crecientes de H-NS reprimen la transcripción de *hilA* (Fig. 4.10). La presencia de 1 μ M de H-NS resultó en una represión de 4.7 veces en la transcripción de *hilA* cuando se compara con los valores obtenidos en la ausencia de esta proteína. Asimismo la adición de 0.5 ó 1 μ M de IHF no afectó a la transcripción de *hilA*. Por el contrario, cuando se añadió IHF a una

concentración de 0.5 μM en presencia de 1 μM de H-NS en la reacción se observó un aumento de 2 veces en la formación de transcritos en comparación con el experimento que contenía solamente 1 μM de H-NS. Estos resultados obtenidos nos indicaron que *in vitro* IHF es capaz de antagonizar el efecto represor de H-NS en la transcripción de *hila*.

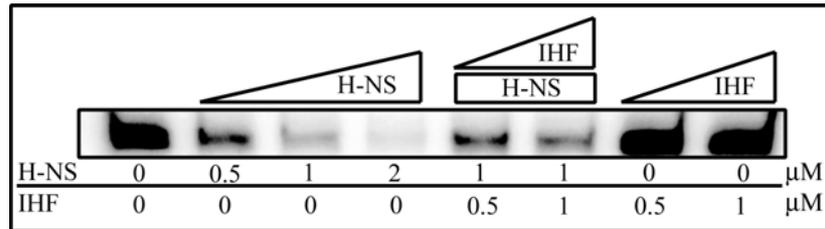


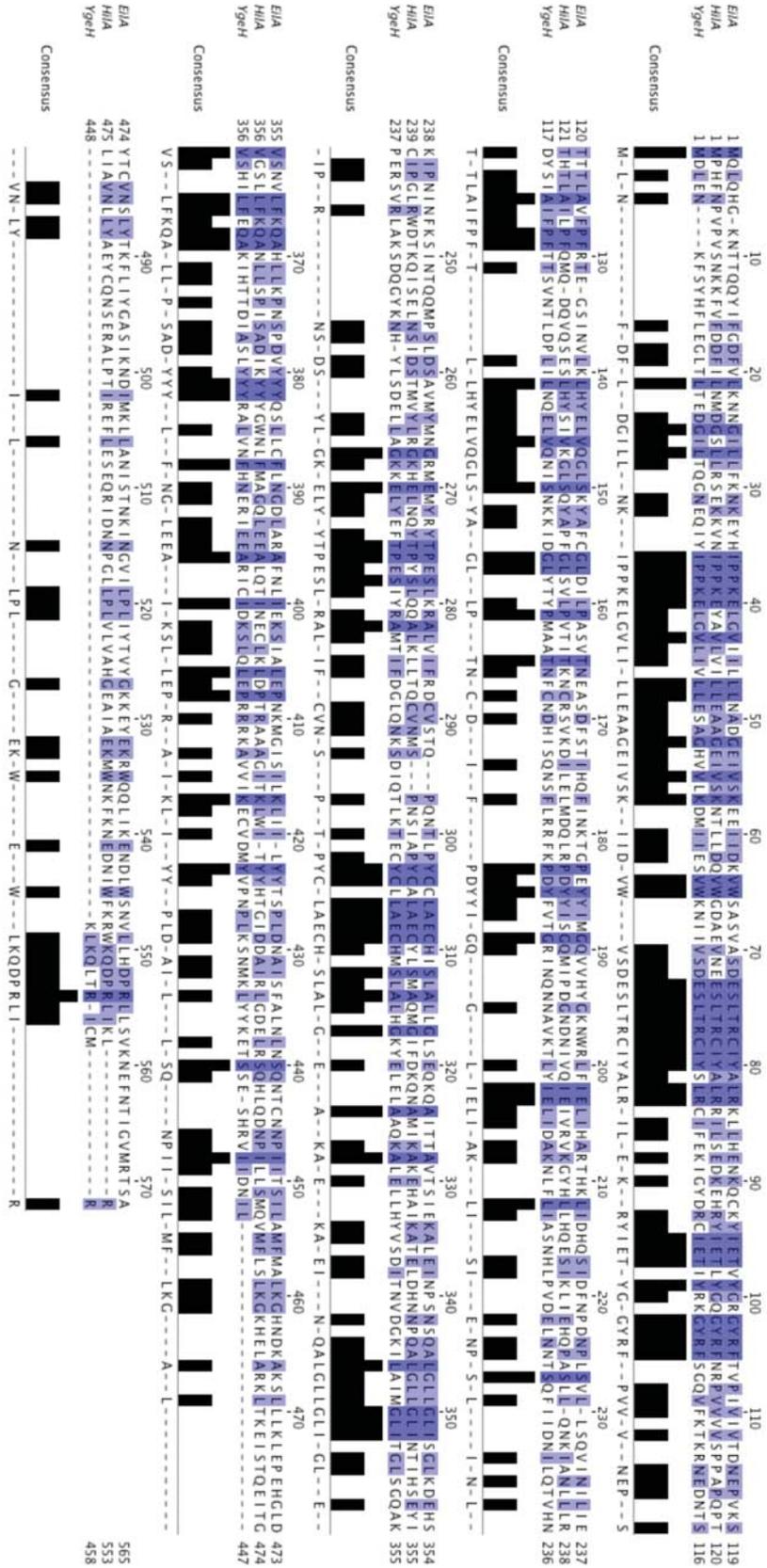
Figura 4.10. Efecto de la presencia de H-NS y IHF en la transcripción de *hila in vitro*. Ensayo de un solo ciclo de transcripción *in vitro* utilizando ADN superenrollado (pTEhila). Las concentraciones de las proteínas H-NS e IHF utilizadas se encuentran indicadas en la figura. Los experimentos de transcripción *in vitro* se realizaron por triplicado y la figura presentada representa uno de los geles obtenidos.

4.2. PROTEÍNAS TIPO HilA CODIFICADAS EN EL GENOMA DE LA CEPA DE *E. coli* 042

4.2.1. El regulador de la isla ETT2, la proteína YgeH, comparte significativa homología en secuencia con las proteínas EilA y HilA

El genoma de la cepa de *E. coli* EAEC O42 fue secuenciado recientemente (Chaudhuri *et al.*, 2010). En base a la anotación genómica depositada en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó una búsqueda por similitud en secuencia aminoacídicas con la proteína HilA de *S. Typhimurium* utilizando la herramienta de bioinformática Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Tal y como era de esperar, se identificó en primer lugar la proteína EilA, la cual había sido previamente caracterizada como una proteína tipo HilA (Sheikh *et al.*, 2006). Adicionalmente encontramos otra proteína, YgeH, caracterizada como hipotético regulador de la invasión bacteriana (*putative invasion gene regulator*) en *E. coli*. Se procedió a alinear las secuencias aminoacídicas de HilA, EilA e YgeH, y tanto EilA como YgeH presentaron un grado significativo de similitud con la proteína HilA (Fig. 4.11). Al compararla con HilA, YgeH presentó una identidad de 23.1% y similitud de 39.6%. Por su parte, EilA presentó una identidad de 32.2% y similitud de 58.5% al compararla con HilA. Cuando se comparan entre ellas presentaron una identidad de 25.9% y similitud de 41.6%.

Figura 4.11. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas YgeH, EilA (ambas de *E. coli* 042) y la proteína HilA (*S. Typhimurium*). Las cajas en azul representan los aminoácidos conservados entre las tres proteínas alineadas. La secuencia consenso está representada por las cajas en negro abajo del alineamiento. Alineamiento obtenido utilizando el programa bioinformático T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>).



Se sabía de antemano que el gen *eilA* se encuentra adyacente al ARNt *selC* en la cepa de *E. coli* EAEC 042 (Ren *et al.*, 2004a). No obstante parece ser que este *locus* está restringido a esta especie (Ren *et al.*, 2004a; Sheikh *et al.*, 2006). Por otro lado, el gen *ygeH* se encuentra en la isla ETT2 y la misma se encuentra adyacente al ARNt *glyU* (Ren *et al.*, 2004a). No obstante parece ser que esta isla se encuentra en otras cepas de *E. coli* como K12 y EHEC O157:H7 (Ren *et al.*, 2004a). Aunque inicialmente nos habíamos planteado estudiar exclusivamente EilA, el descubrimiento de la notable similitud entre YgeH y HilA nos indujo a estudiar conjuntamente ambos reguladores (Fig. 4.12).

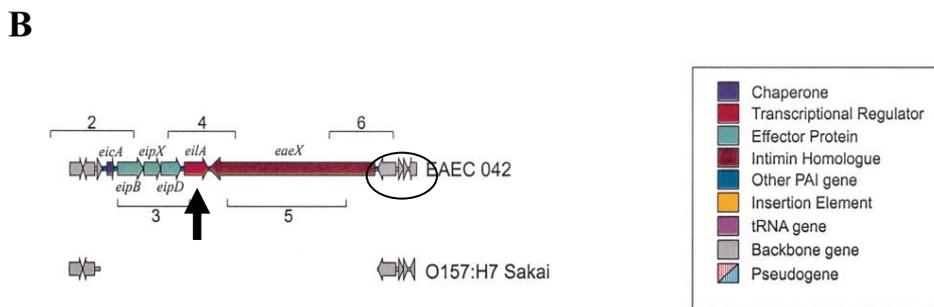
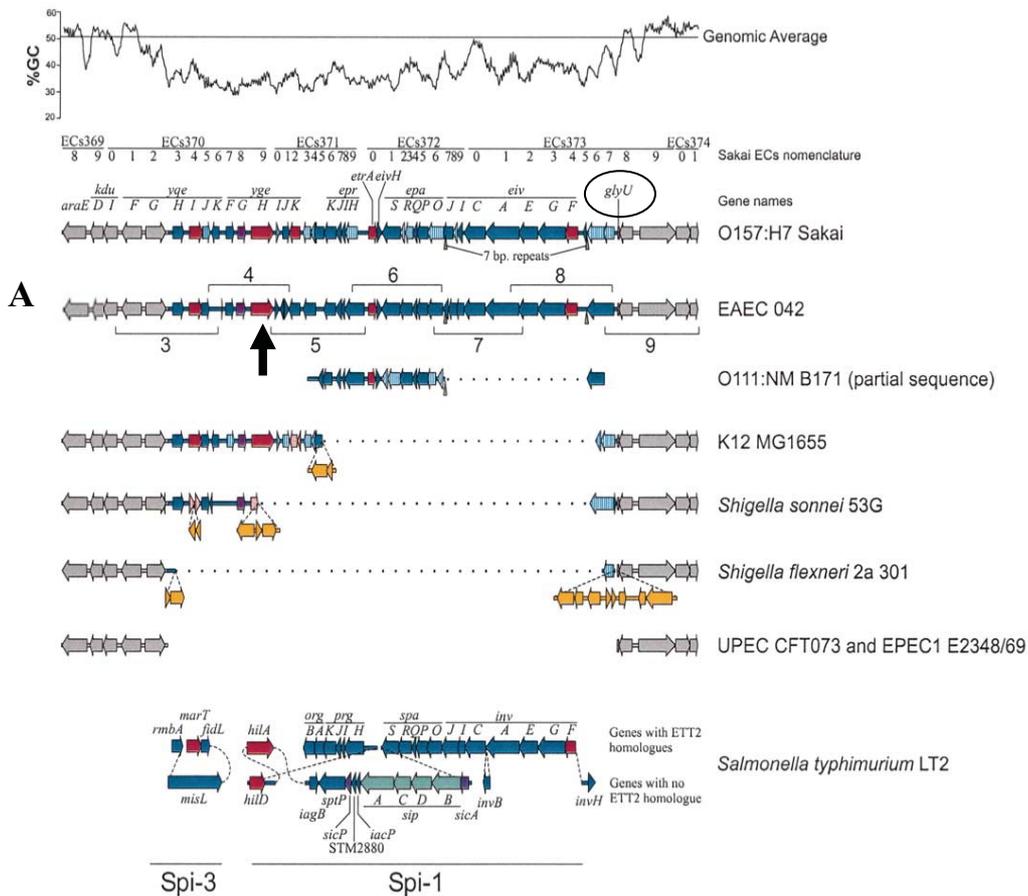


Figura. 4.12. Representación esquemática de las islas de patogenicidad ETT2 y *eip*. A) Estructura de la isla de patogenicidad ETT2 comparada entre varias cepas de *E. coli* y *Shigella*, y comparación con las regiones de las SPI-1 y SPI-3 de *S. Typhimurium*. Los genes homólogos están alineados verticalmente. Las inserciones ocurridas a lo largo de la escala evolutiva están representadas por las flechas en amarillo y las deleciones están representadas por líneas discontinuas. B) Estructura de la isla *eip* en la cepa 042. Los genes *ygeH* (A) y *eilA* (B) codifican para reguladores que presentan un elevado grado de similitud con HilA. Se encuentran destacados por flechas en negro. Los círculos en negro representan los ARNt. Adaptado de (Ren *et al.*, 2004a).

4.2.2. Complementación en *trans* del fenotipo HilA⁻ en la cepa SV5015 por las proteínas EilA e YgeH

Tal y como ya se ha reseñado en la introducción, la proteína HilA es el regulador central de la SPI1 de *S. Typhimurium*. La deleción del gen *hila* conlleva a un fenotipo atenuado en la invasión de células *in vitro* e *in vivo* que es equivalente a la deleción de la isla SPI1 por completo (Ellermeier *et al.*, 2005). En condiciones favorables a invasión, la proteína HilA se une a los promotores *prg/org* y *inv/spa* activando la transcripción de los mismos, lo que en cascada provoca la expresión del operon *sic/sip* por la proteína InvF codificada en el operon *inv/spa* (Ellermeier & Slauch, 2007; Lostroh & Lee, 2001). De la expresión del operon *sic/sip* se destaca la proteína SipA (*Salmonella invasion protein A*). SipA es una de las proteínas efectoras secretadas por la maquinaria de secreción del tipo III codificada por SPI1. Está involucrada en la unión a actina celular y mejora la eficiencia en la invasión por promover la polimerización y prevenir el desensamblaje de los filamentos de actina (McGhie *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta la similitud entre HilA y las proteínas EilA e YgeH, nos planteamos como primera hipótesis de trabajo analizar si alguna de estas proteínas podía reemplazar funcionalmente a HilA en la cepa SV5015 de *S. Typhimurium*. Para llevar a cabo estos estudios se utilizó la cepa MHS-1 (SV5015 $\Delta hila$) y se llevó a cabo la inserción de la etiqueta 3XFLAG en la región carboxi-terminal de la proteína SipA en la cepa MHS-1, generando la cepa MHS3. Como control se insertó la misma construcción en la cepa salvaje de *S. Typhimurium* (MHS-2). La inserción de la etiqueta 3XFLAG en el extremo C-terminal se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.8.6

de materiales y métodos. Como indicador de la expresión de HilA en estas construcciones se decidió utilizar la expresión de SipA. Para los estudios de complementación en *trans* los genes *eilA* e *ygeH* de *E. coli* EAEC 042 fueron clonados en el vector de expresión pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995), generando los plásmidos pBADEilA y pBADYgeH respectivamente. Como control de la complementación también se utilizó el gen *hilA* de *S. Typhimurium* clonado en el mismo vector, generando el plásmido pBADHilA. Las cepas MHS-2 y MHS-3 fueron transformadas con los plásmidos pBAD18, pBADHilA, pBADEilA y pBADYgeH.

Los ensayos de complementación en *trans* fueron realizados en medio de cultivo líquido LB en presencia de 100 µg/ml de carbenicilina, marcador del plásmido pBAD18. Paralelamente los mismos cultivos fueron crecidos en presencia de 0,2% de L-arabinosa, dado que el vector pBAD18 presenta la expresión de los genes clonados regulada por la presencia de este azúcar.

Los cultivos crecidos en LB o LB L-arabinosa fueron incubados a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 2,0. A continuación se recogió 1 ml de cada cultivo y se procedió a precipitar las proteínas secretadas de acuerdo con el apartado 3.9.1 de materiales y métodos. Las proteínas concentradas fueron sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) en geles al 10% y teñidas con una solución de azul de Coomassie de acuerdo con el apartado 3.9.3.2. de materiales y métodos. Adicionalmente, réplicas de estos geles fueron paralelamente transferidas a membranas de PVDF, de acuerdo con el apartado 3.9.4.1. de materiales y métodos, llevándose a cabo la inmunodetección de SipA::3XFLAG utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-FLAG M2 (SIGMA) a una dilución de 1:10.000 en PBS-tritón 0,2%, leche 2%. Los detalles del protocolo se encuentran en el apartado 3.9.4.2 de materiales y métodos.

La proteína SipA::3XFLAG fue correctamente detectada en la cepa parental HilA⁺ (MHS-2) cuando fue crecida en LB o LB L-arabinosa, tanto en el gel teñido con azul de Coomassie como en la inmunodetección (Fig. 4.13 A y C). En presencia del plásmido control, pBAD18, se observa una menor expresión de SipA::3XFLAG. Tal y como sería esperable, en el mutante $\Delta hilA$ (MHS-3) no se observa la expresión de SipA::3XFLAG. Por lo que respecta a los ensayos de complementación, es destacable que, en ausencia de arabinosa, ninguna de las tres construcciones (plásmidos pBADHilA, pBADEilA y pBADYgeH) induce la expresión de SipA en la cepa MHS-3. Por el contrario, en los cultivos crecidos en presencia de 0,2% de L-arabinosa se observa la expresión de SipA::3XFLAG tanto en las cepas portadoras de los plásmidos

pBADEilA, pBADIYgeH como, tal y como se esperaría, en presencia del plásmido pBADHilA (Fig. 4.13 B y D). Estos resultados claramente evidencian que las proteínas EilA e YgeH son capaces de complementar en *trans* el fenotipo HilA⁻ en *S. Typhimurium*.

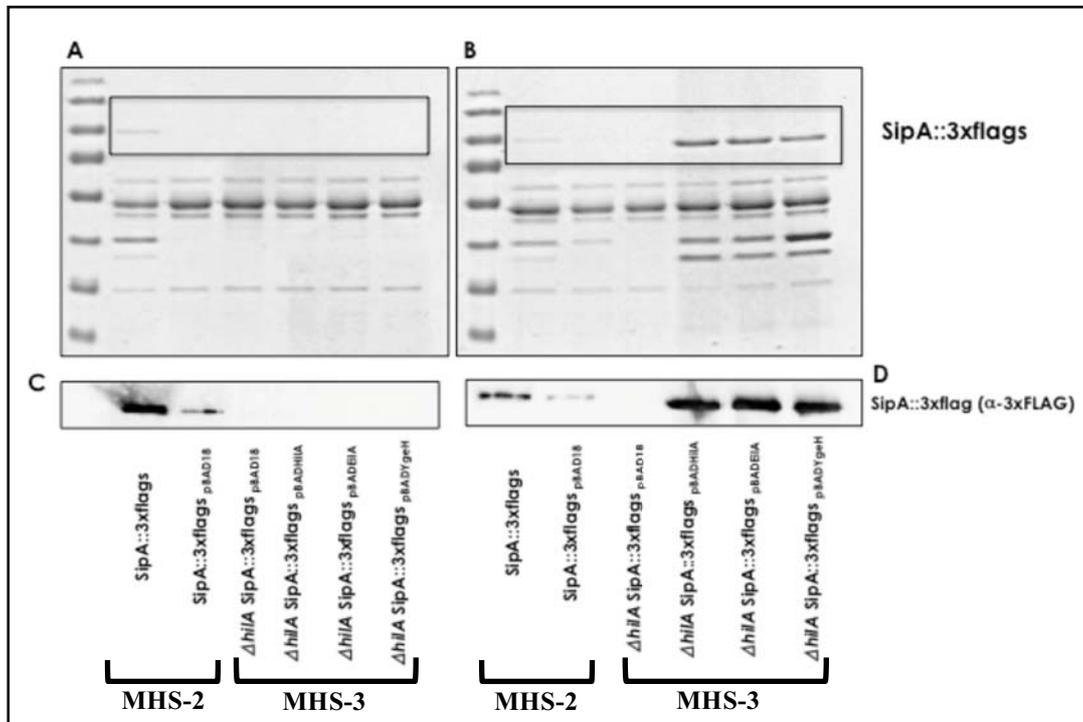


Figura 4.13. Las proteínas EilA e YgeH son capaces de complementar en *trans* el fenotipo $\Delta hila$ en *S. Typhimurium*. Perfil electroforético de proteínas secretadas por las cepas MHS-2 y MHS-3. A y B) Geles SDS-PAGE 10% teñidos con azul de coomassie. A) Perfil de las proteínas secretadas por las cepas MHS-2 y MHS-3 obtenidas de cultivos crecidos en medio LB; B) Perfil de las proteínas secretadas por las cepas MHS-2 y MHS-3 obtenidas de cultivos crecidos en medio LB L-arabinosa 0,2%. C y D) Inmunodetección de la proteína SipA::3XFLAG obtenida de las cepas MHS-2 y MHS-3; C) Inmunodetección de SipA::3XFLAG obtenida de cultivos crecidos en LB; D) Inmunodetección de SipA::3XFLAG obtenida de cultivos crecidos en LB L-arabinosa 0,2%.

4.2.3. Las proteínas EilA e YgeH activan la expresión de SipA vía InvF en *S. Typhimurium*

La cascada reguladora que desencadena la expresión de SipA requiere la correcta expresión de InvF lo cual es mediado por la proteína HilA (Darwin & Miller,

1999; Eichelberg & Galán, 1999; Klein *et al.*, 2000; Lostroh *et al.*, 2000), (véase la Fig. 1.15 de la introducción de esta tesis). Para determinar si las proteínas EilA e YgeH actúan de la misma manera que HilA en la activación de SipA, es decir, mediando primeramente la expresión de InvF, decidimos utilizar una fusión transcripcional cromosómica *invF::lacZ* (cepa SV5258, gentilmente cedida por J. Casadesús) para valorar la expresión del promotor *invF* a través de la actividad β -galactosidasa. Se transdujo la mutación *hilA::Cm* de la cepa MHS-C1 a la cepa SV5258 utilizando el fago P22 según el protocolo indicado en el apartado 3.7.4 de materiales y métodos. Se transformó a la cepa SV5258 el plásmido pBAD18 y a la cepa SV5258 Δ *hilA* los plásmidos pBAD18, pBADEilA, pBADYgeH y pBADHilA. A continuación los transformantes fueron crecidos en medio LB y LB L-arabinosa 0,02% a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 2,0. La transcripción de *invF* fue cuantificada por el ensayo de β -galactosidasa de acuerdo con el apartado 3.9.5.1 de materiales y métodos. Como es posible visualizar en la figura 4.14, ni la presencia de L-arabinosa ni la del plásmido pBAD18 afectaron la expresión de *invF* en la cepa *hilA*⁺ (SV5258). Por otro lado, en la cepa que posee la mutación *hilA::Cm* (SV5258 Δ *hilA*), la presencia de los plásmidos pBADEilA, pBADYgeH y pBADHilA, aumentó drásticamente la transcripción de *invF* cuando las células fueron crecidas en presencia de L-arabinosa (Fig. 4.14.) Por lo tanto, el efecto de las proteínas EilA e YgeH en la expresión de SipA parece tener lugar a través de la activación de la transcripción de *invF*, de igual manera que sucede con HilA.

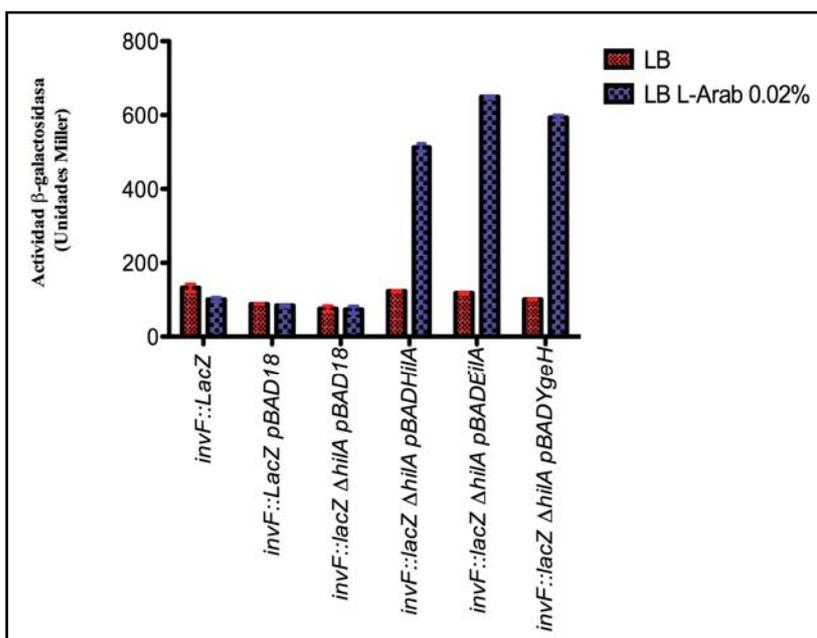


Figura 4.14. EilA e YgeH activan la expresión de SipA vía InvF. Resumen de los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) obtenidos de cultivos por triplicado crecidos en medio LB o LB L-arabinosa 0,02% a 37°C. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

4.2.4. Regulación de la expresión de los moduladores EilA e YgeH

Dentro de la estrategia de intentar establecer una relación estructural y funcional entre el modulador HilA de *S. Typhimurium* y los reguladores EilA e YgeH de *E. coli* 042, decidimos estudiar si existe también algún tipo de similitud en el esquema de regulación de HilA y de las proteínas EilA e YgeH. Teniendo en cuenta la caracterización realizada en este trabajo de la regulación de HilA y el papel de las proteínas asociadas al nucleoide H-NS y Hha en la modulación dependiente de temperatura y fase de crecimiento, y también el posible papel de IHF, en esta parte del trabajo decidimos también estudiar como la síntesis de los moduladores EilA e YgeH responde a los factores ambientales y de crecimiento utilizados para estudiar la regulación de *hila*. La expresión de ambos moduladores fue evaluada a distintas temperaturas (25°C y 37°C) y niveles de osmolaridad (medio LB y LB 0M de NaCl), analizando muestras obtenidas tanto en fase exponencial como al inicio de fase estacionaria. Fusiones transcripcionales *eilA::lacZ* e *ygeH::lacZ* fueron obtenidas en el cromosoma de la cepa AAG1 de *E. coli* y en los respectivos mutantes isogénicos Δhns , Δhha , $\Delta ihfA$ y $\Delta ihfB$. La expresión de estos dos moduladores fue estudiada en la cepa de *E. coli* MG1655, ya que no fue posible obtener tales fusiones en el cromosoma de la cepa de *E. coli* EAEC 042.

Por lo que hace referencia a la regulación transcripcional de *eilA*, en todas las condiciones analizadas, el parámetro que ha podido comprobarse que significativamente influye en la expresión de este modulador es la fase de crecimiento. En la mayoría de las condiciones analizadas, tales como crecimiento a alta/baja osmolaridad, temperatura y pH, se observó que existe una mayor expresión en cultivos obtenidos en el inicio de fase estacionaria (Fig. 4.15). Si bien la expresión de *eilA* se encuentra también reprimida en condiciones de baja osmolaridad y baja temperatura, el efecto de represión (aproximadamente de dos veces) es muchísimo más modesto que el que se observa con *hila* (Fig. 4.15). Teniendo en cuenta que con las condiciones ambientales usadas con *hila* no observamos un efecto regulador muy drástico con *eilA*, decidimos también analizar el efecto de otras condiciones ambientales tales como la anaerobiosis o el pH ácido. No obstante, las mismas tampoco parecen influenciar la expresión transcripcional de *eilA*. También se compararon los crecimientos en los medios LB y LB:DMEM, sin que se observasen diferencias significativas en la expresión de *eilA*. Ha sido descrito anteriormente (Sheikh *et al.*, 2006) un aumento de los transcritos de *eilA* en cultivos de

la cepa 042 crecidos en medio LB:DMEM. No obstante en la cepa AAG1 no se observa el mismo efecto en la expresión de la fusión transcripcional *eilA::lacZ*.

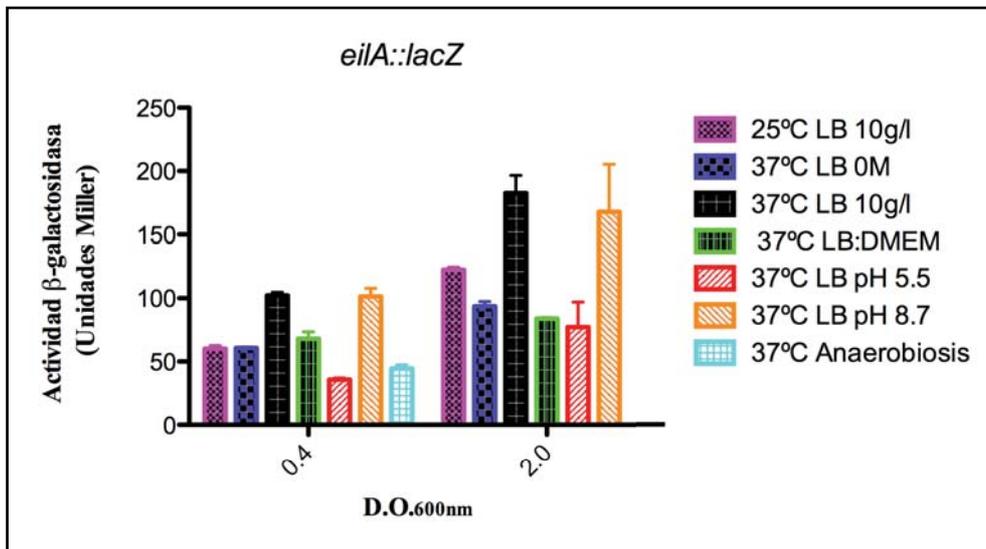


Figura 4.15. Efecto de distintas condiciones ambientales y de crecimiento en la expresión transcripcional de la fusión *eilA::lacZ*. Los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) fueron obtenidos de tres cultivos independientes crecidos en los correspondientes medios. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Como complemento a estos estudios, se analizó el efecto de los alelos *hha*, *hms*, *ihfA* e *ihfB* sobre la expresión de *eilA* en las diferentes condiciones ambientales utilizadas previamente (Figs. 4.16 A y B). En relación a los mutantes, la mutación en el gen *hha* no alteró la expresión transcripcional de *eilA* en ninguna de las condiciones usadas (resultados no presentados). Por el contrario, la mutación en el gen *hms* provocó un aumento moderado en la expresión transcripcional de *eilA* (aproximadamente de dos veces) pero, a diferencia del ejemplo de *hila*, este efecto fue independiente de la temperatura o de la osmolaridad. Con respecto a las mutaciones en los alelos *ihfA* y *ihfB*, por sí solas o en combinación con la mutación en *hms*, no afectaron significativamente la expresión transcripcional de *eilA*, (Fig. 4.16 A y B).

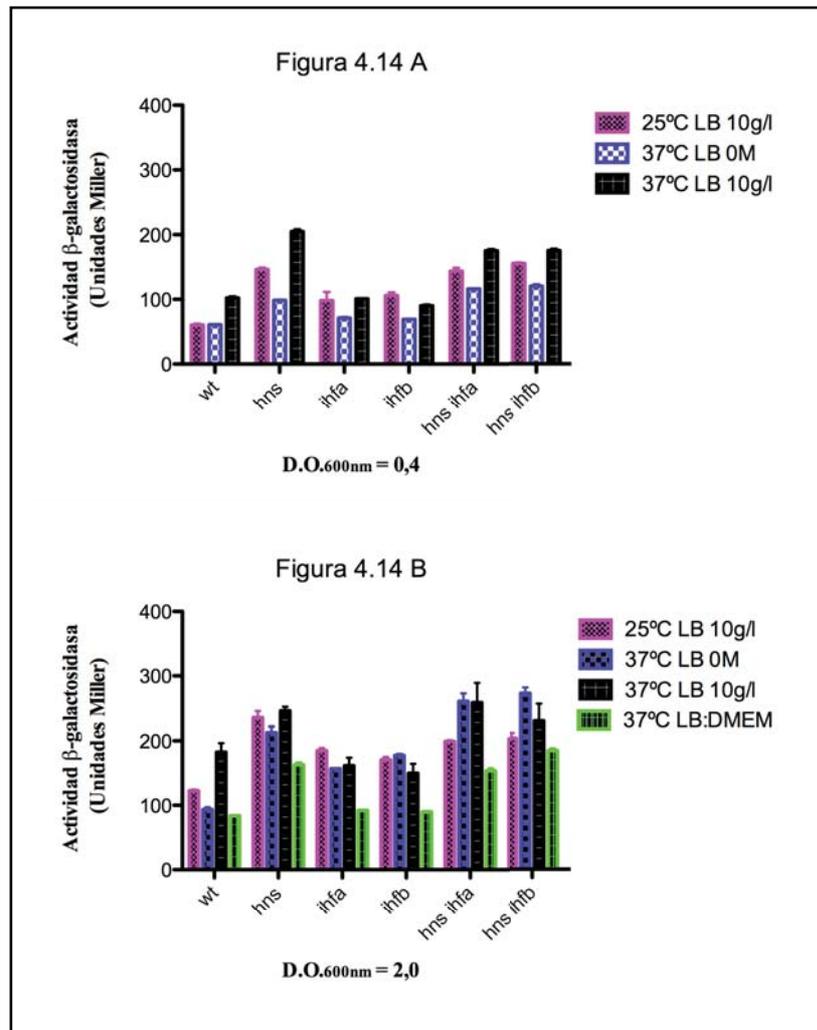


Figura 4.16. Efecto de los alelos *hns*, *ihfA* e *ihfB* sobre la expresión de la fusión transcripcional *eilA::lacZ* en cultivos crecidos en distintas condiciones ambientales y de crecimiento. Los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) corresponden a la media de tres cultivos independientes obtenidos en los correspondientes medios de cultivo. A) Resultados obtenidos de cultivos en fase exponencial de crecimiento y B) Resultados obtenidos de cultivos en inicio de fase estacionaria de crecimiento. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Por lo que respecta al gen *ygeH*, los perfiles de expresión de la fusión transcripcional *ygeh::lacZ* obtenidos en las mismas condiciones ambientales que las utilizadas para *eilA*, mostraron que el efecto de inducción de la expresión al inicio de la fase de crecimiento es muy modesto. Además no se observó ningún efecto de regulación importante en cultivos crecidos a diferentes temperaturas u osmolaridades. El análisis del efecto de otros factores, tales como el medio LB:DMEM, anaerobiosis,

pH ácido o pH alcalino tampoco permitió determinar un efecto regulador importante de los factores ambientales estudiados (Fig. 4.17).

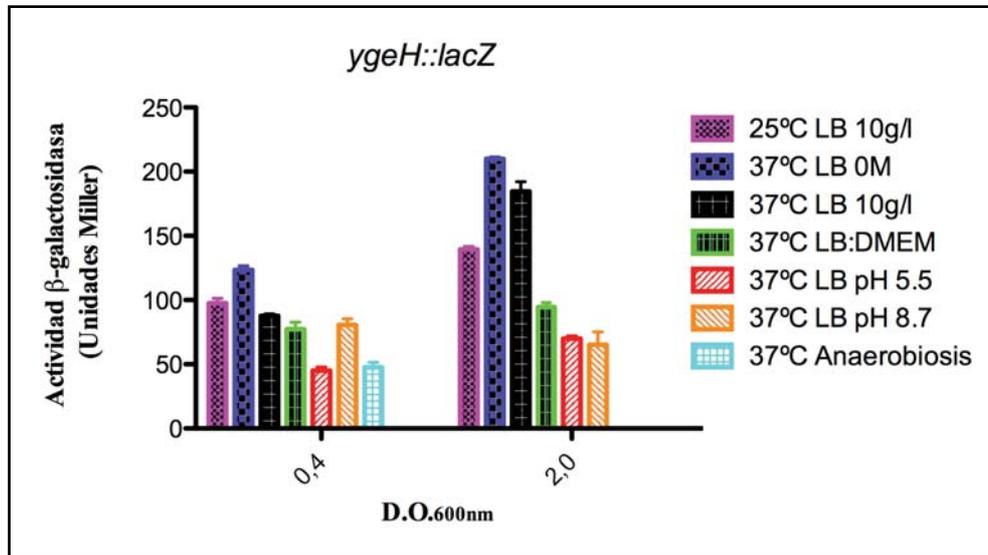


Figura 4.17. Expresión de la fusión transcripcional *ygeH::lacZ* en cultivos crecidos en diferentes condiciones ambientales. Las muestras fueron obtenidas tanto de cultivos en fase exponencial como al inicio de la fase estacionaria. Los valores de actividad β -galactosidasa (U.M.) corresponden a la media de tres cultivos independientes obtenidos en los diferentes medios de cultivo. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Por lo que hace referencia a las mutaciones en los alelos *hns* y *ihf*, la proteína H-NS reprime significativamente la expresión de *ygeH* en las distintas condiciones utilizadas, incluyéndose el inicio de fase estacionaria. IHF parece ser requerida para la correcta expresión de YgeH. No obstante, la expresión de *ygeH* en presencia de la proteína H-NS, nos sugiere que, en la región reguladora de *ygeH*, IHF pueda estar antagonizando el efecto represor de H-NS, (Figs. 4.18 A y B).

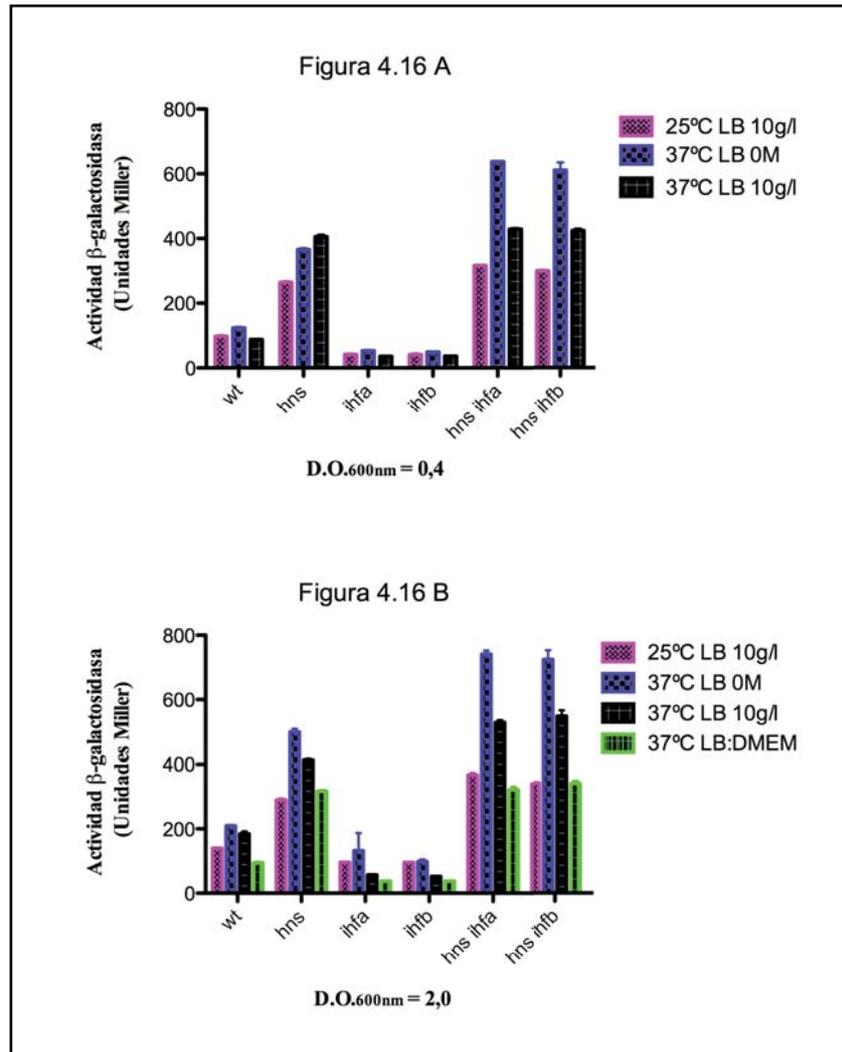


Figura 4.18. Efecto de los alelos *hns*, *ihfA* e *ihfB* sobre la expresión de la fusión transcripcional de *ygeH::lacZ*. Los valores de actividad β-galactosidasa (U.M.) corresponden a la media de tres cultivos independientes obtenidos en los correspondientes medios de cultivo. A) Resultados obtenidos de cultivos en fase exponencial de crecimiento y B) Resultados obtenidos de cultivos en inicio de fase estacionaria de crecimiento. Se muestra la derivación estándar de las medidas.

Para confirmar la participación de la proteína H-NS en la regulación de los genes *eilA* e *ygeH*, decidimos realizar ensayos de EMSA utilizando los fragmentos de ADN correspondientes a las regiones promotoras de *eilA* e *ygeH*. Los detalles de la técnica utilizada para el EMSA se encuentran en el apartado 3.5.8. de materiales y métodos. La unión de la proteína H-NS a ambas secuencias promotoras fue confirmada por los retardos presentados por los diferentes fragmentos de ADN en presencia de concentraciones crecientes de H-NS (Figs. 4.19 A y B).

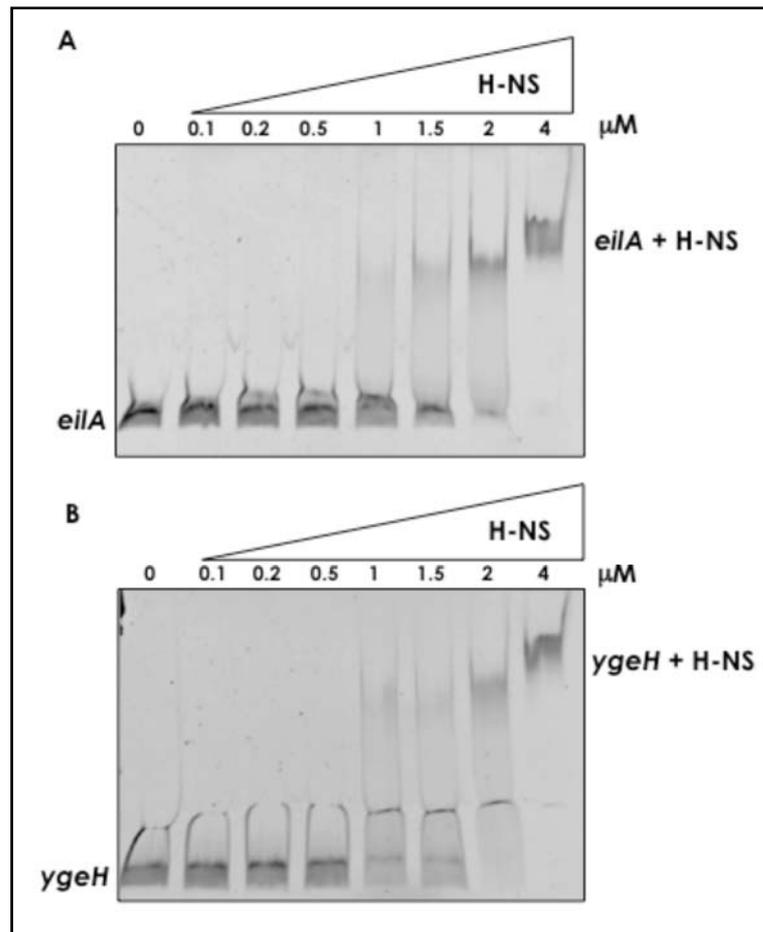


Figura 4.19. La proteína H-NS es capaz de unirse a las regiones promotoras de los genes *eilA* e *ygeH*. Perfiles de retardos en gel de ambas regiones promotoras de los genes *eilA* (A) e *ygeH* (B), en presencia de concentraciones crecientes de H-NS.

Para evidenciar la especificidad de la unión dada por H-NS, se realizó un ensayo de EMSA de competición utilizando las regiones promotoras de los genes *eilA* e *ygeH* y además se incluyó un ADN control correspondiente a una secuencia localizada aguas arriba del gen *hlyR* del operon *hly*. Esta región reguladora de *hlyR* se sabe de antemano que no presenta cajas de unión a H-NS (Madrid *et al.*, 2002b). El ensayo de EMSA competitivo evidencia que H-NS se une específicamente a ambas regiones reguladoras de los genes *eilA* e *ygeH* (Fig. 4.20).

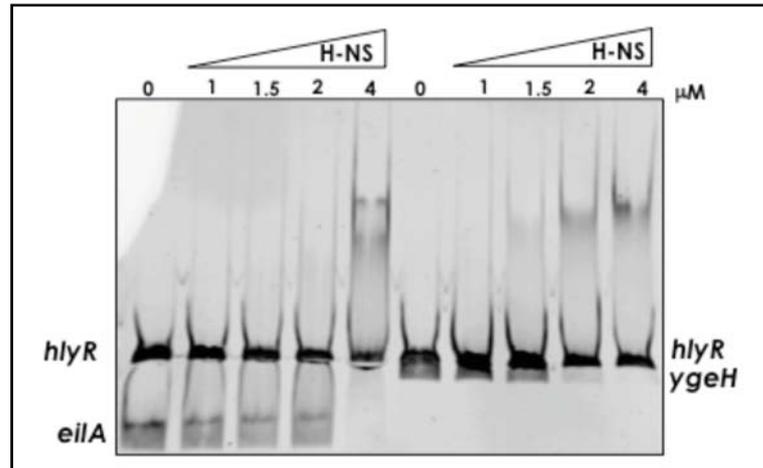


Figura 4.20. La proteína H-NS se une específicamente a las secuencias reguladoras de los genes *eilA* e *ygeH*. Perfil de retardos en gel de ambas regiones promotoras de los genes *eilA* e *ygeH* en presencia de un ADN competidor (*hlyR*) y en presencia de concentraciones crecientes de H-NS.

4.2.5. Regulación cruzada de EilA e YgeH entre los regulones encontrados en las islas de patogenicidad ETT2 y *eip* en EAEC 042

Teniendo en cuenta que las proteínas EilA e YgeH son capaces de compensar la pérdida de HilA en un mutante $\Delta hilA$ de *S. Typhimurium*, planteamos la hipótesis de que también en la cepa de *E. coli* EAEC 042 cada una de las dos proteínas pudiese reemplazar funcionalmente a la otra, y existiese regulación cruzada en los genes que se localizan en las islas de patogenicidad ETT2 y *eip* en EAEC 042. Para comprobar esta hipótesis, escogimos por una parte el gen *eivF*, el cual codifica para una proteína tipo-InvF y se encuentra en la isla ETT2 (véase la Fig. 1.21 de la introducción de esta tesis), donde supuestamente la proteína YgeH actuaría como regulador transcripcional (Ren *et al.*, 2004a). Por otra parte escogimos también el gen *air* (*aeX*), el cual codifica para una proteína tipo intimina y que se encuentra en la isla *eip* (véase la Fig. 1.21 de la introducción de esta tesis), donde supuestamente la proteína EilA actuaría como regulador transcripcional (Sheikh *et al.*, 2006). La expresión de estos dos genes fue cuantificada por RT-PCR en la cepa 042 salvaje y en los mutantes isogénicos $\Delta eilA$ y $\Delta ygeH$, y también en el doble mutante $\Delta eilA\Delta ygeH$ (Fig. 4.21). Por lo que hace referencia a expresión de *eivF*, se puede evidenciar que la transcripción se presentó reducida no solamente en el mutante $\Delta ygeH$, pero también en el mutante $\Delta eilA$.

Reforzando el modelo de regulación cruzada, pudo ponerse de manifiesto que en el doble mutante $\Delta eilA\Delta ygeH$ también se observó una reducción en la transcripción de *eivF* (Fig. 4.21A). Por lo que respecta a la expresión del gen *air*, la misma se presentó reducida en el mutante $\Delta eilA$, tal y como era de esperar. No obstante, en el mutante $\Delta ygeH$ la reducción fue poco importante. El hecho de que la expresión de *air* en el doble mutante $\Delta eilA\Delta ygeH$ se comporte de manera similar al observado en el mutante $\Delta eilA$ sugiere que no existe regulación cruzada entre YgeH y *air* (Fig. 4.21B). Por el contrario, los resultados obtenidos con el gen *eivF* evidenciaron que, al menos en algún caso, el regulón de YgeH podría estar siendo también modulado por EilA. La cuantificación de los transcritos de *eivF* y *air* fue normalizada en relación a los transcritos correspondientes al ARNr 16S (Fig. 4.21C).

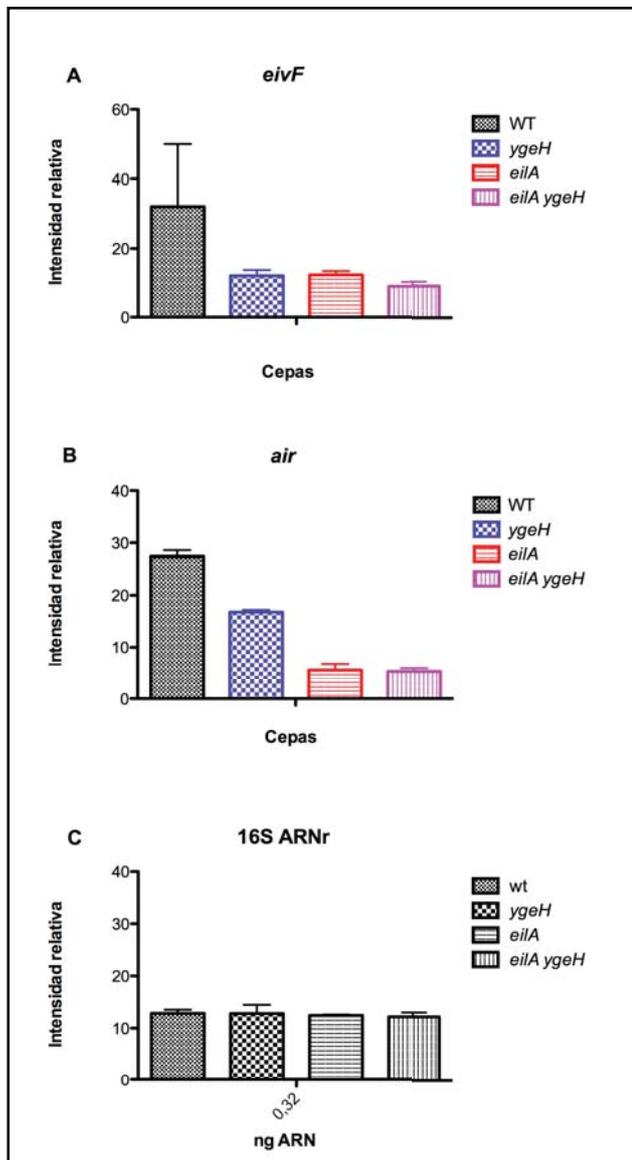


Figura 4.21. Regulación cruzada entre los regulones ETT2 y Eip en la cepa EAEC 042. RT-PCR de los genes *eivF* (A) y *air* (B) a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 2,0. En C) se presenta la normalización de los transcritos basados en el ARNr 16S de las respectivas cepas. Los datos se corresponden con el promedio de tres réplicas. Las intensidades se relativizaron frente a la intensidad de la banda de la cepa salvaje utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad). Se muestra la derivación estándar de las medidas.

4.3. PAPEL DE LA MUTACIÓN Δhha EN *E. coli* EAEC 042

4.3.1. La pérdida de la proteína Hha reduce la formación de biofilm y aumenta la agregación celular en *E. coli* 042 a 37°C

Durante la búsqueda de un fenotipo para el modulador YgeH en la cepa 042, realizamos ensayos de formación de biofilms y agregación celular, además de con los mutantes $\Delta ygeH$, también con mutantes Δhns y Δhha derivados de la misma cepa. Mientras que los mutantes $\Delta ygeH$ y Δhns no influyen la formación de biofilms y tampoco la agregación celular, pudo observarse de forma inesperada en el mutante Δhha tanto una fuerte desregulación en la formación de biofilms como en la agregación celular (Fig. 4.22 A y B).

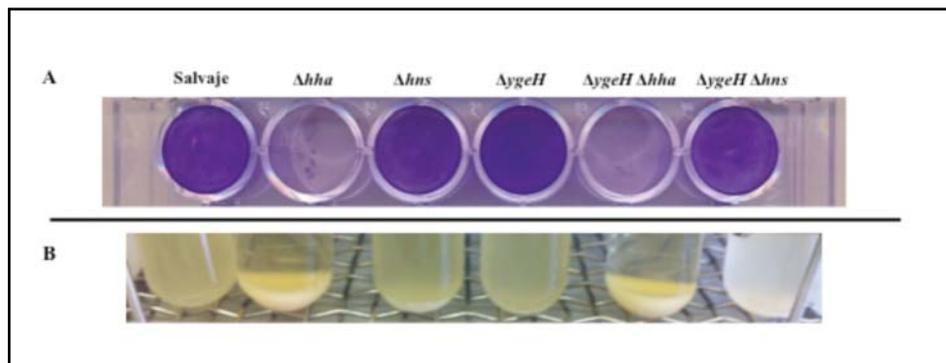


Figura 4.22. Fenotipo observado con la pérdida de la proteína Hha en *E. coli* 042. A) Formación de biofilm a 37°C realizado de acuerdo con el apartado 3.11 de materiales y métodos. B) Agregación celular de cultivos crecidos a 37°C en medio LB realizado de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos.

Tanto el hecho de que el efecto de la mutación *hha* fuese independiente de la mutación *hns* como el hecho de que los efectos fenotípicos fuesen muy importantes en la formación de biofilm y también en la agregación celular, nos indujeron a analizar en más detalle este fenómeno. En primer lugar se llevaron a cabo distintos estudios en la formación de biofilm y capacidad de agregación celular del mutante Δhha de 042 y de los respectivos controles Δhns , $\Delta ygeH$, y dobles mutantes, $\Delta ygeH \Delta hha$, $\Delta ygeH \Delta hns$. Los protocolos utilizados para la cuantificación de agregación celular y capacidad de

formación de biofilm se encuentran en los apartados 3.10 y 3.11 de materiales y métodos, respectivamente. Por lo que hace referencia a los resultados encontrados de agregación celular y formación de biofilm (Fig. 4.23 A y B), se observa un aumento en la capacidad de agregación celular en el mutante Δhha (Fig. 4.23A) y también se observa una menor capacidad en la formación de biofilm de un orden de 2 veces (Fig. 4.23B). Aparte del mutante hha , el resto de mutantes analizados en los ensayos comentados anteriormente presentaron valores similares a cepa salvaje (Fig. 4.23 A y B).

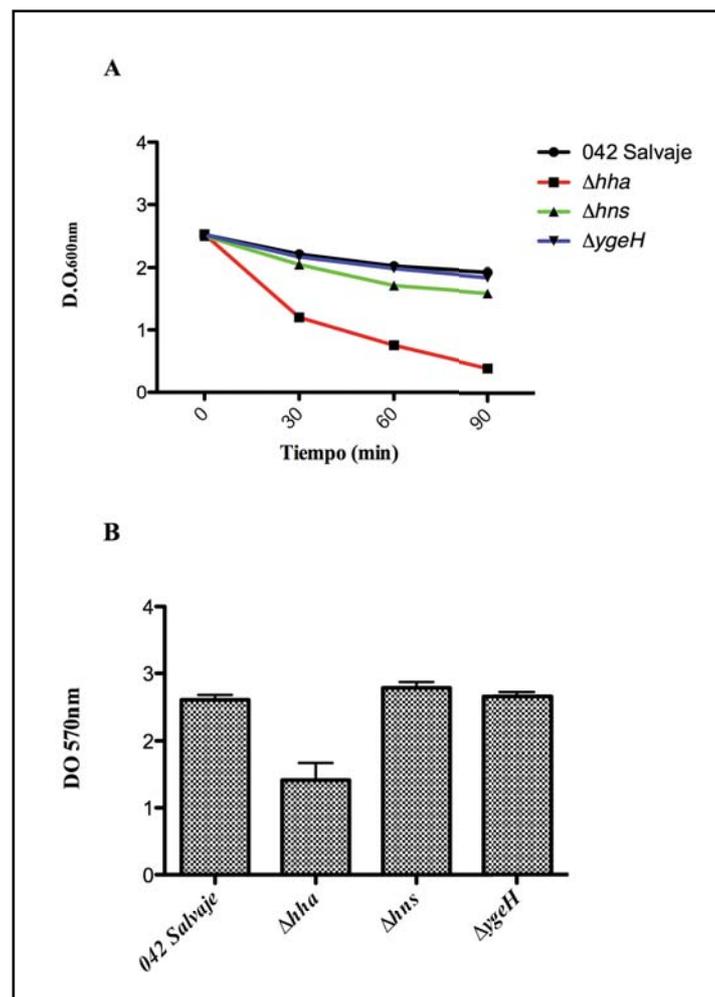


Figura 4.23. Cuantificación de los distintos fenotipos observados con la pérdida de la proteína Hha en *E. coli* 042. A) Agregación celular de cultivos crecidos a 37°C en medio LB realizado de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos. B) Formación de biofilm a 37°C realizado de acuerdo con el apartado 3.11 de materiales y métodos. Los valores representados corresponden al promedio y variación estándar de tres experimentos independientes.

Es importante resaltar aquí que el fenotipo observado de agregación celular en el mutante Δhha es dependiente de temperatura, es decir, no se observa este fenotipo en cultivos crecidos a 25°C en medio LB (Fig. 4.24). En relación a formación de biofilm, se observó que a 25°C esta cepa, EAEC 042, no es capaz de formar biofilm y por esto motivo el efecto de la mutación *hha* sobre la formación de biofilm no ha sido analizado.

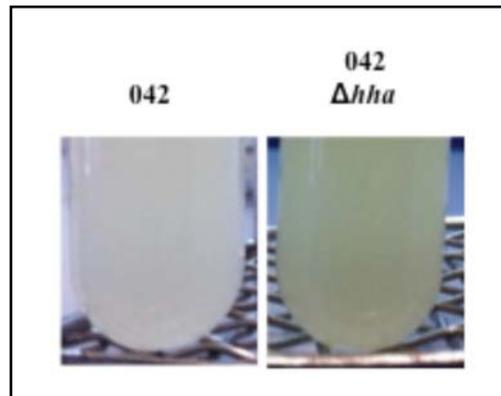


Figura 4.24. El fenotipo de agregación celular observado en el mutante Δhha es dependiente de temperatura. Los cultivos fueron incubados a 25°C y procesados de acuerdo con el protocolo de agregación celular apartado 3.10 de materiales y métodos.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la regulación por la proteína Hha normalmente se asocia a una regulación por parte de la proteína H-NS (revisado por Madrid *et al.*, 2007). Debido a nuestro interés en aclarar la regulación de determinantes de virulencia en esta cepa de *E. coli* 042 y también debido a esta regulación dependiente de Hha y aparentemente en este caso ser independiente de H-NS, decidimos investigar más a fondo y tratar de entender este fenotipo.

4.3.2. El fenotipo de agregación celular del mutante de 042 Δhha puede ser complementado en *trans* con el plásmido pBADHha

Para confirmar que el fenotipo observado de agregación celular en el mutante Δhha es debido a la pérdida de la proteína Hha y descartar cualquier otro efecto no específico, decidimos complementar en *trans* este mutante con el plásmido pBADHha. Este plásmido posee la secuencia codificante para el gen *hha* salvaje de *S. Typhimurium* clonada bajo el control del promotor inducible por L-arabinosa del vector pBAD18. La cepa 042 Δhha fue transformada con los plásmidos pBAD18, pBADHha y, como

control de especificidad, con el plásmido pBADIHF $\alpha\beta$. Los clones resistentes a carbenicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ fueron inoculados en medio LB en presencia de este mismo antibiótico suplementado con 0,45% de glucosa o con 0,2% de L-arabinosa. Los cultivos fueron incubados a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 2,0. La cuantificación de la agregación celular (Fig. 4.25B), fue realizada de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos.

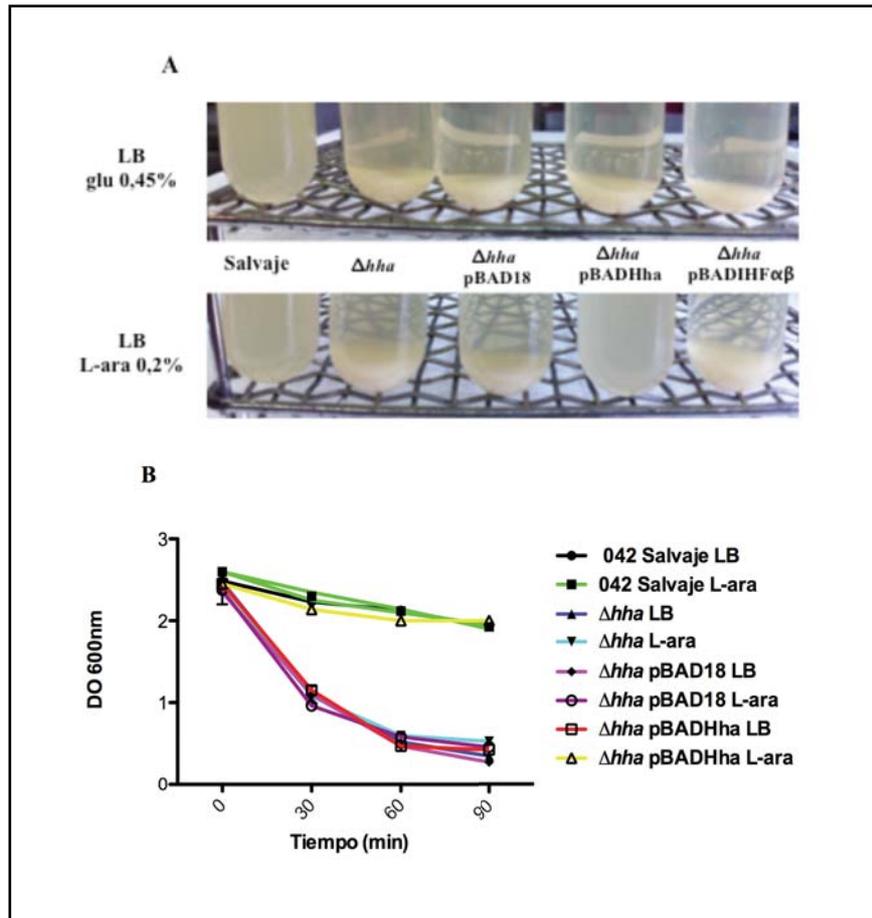


Figura 4.25. El fenotipo de agregación celular de la cepa de 042 Δhha es debido a la pérdida de la proteína Hha. Ensayos de complementación en *trans* de la mutación Δhha con el plásmido pBADHha. A) Fotografía de los cultivos utilizados para la cuantificación de agregación celular. En esta imagen se incluyó además del vector control, pBAD18, el plásmido pBADIHF $\alpha\beta$ que expresa las dos subunidades que forman la proteína IHF bajo el promotor inducible por L-arabinosa. B) Cuantificación de la agregación celular en el experimento de complementación en *trans*. La cuantificación fue realizada de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos. Los valores representados corresponden al promedio y variación estándar de tres experimentos independientes.

4.3.3. Efecto de la mutación Δhha en la expresión de los genes *aggR*, *aafA* y *aap* de *E. coli* 042

Tal y como ha sido referido en el apartado 1.8.1.2, la adhesina AafA es una de las posibles *aggregative adherence fimbriae* encontradas en *E. coli* EAEC (Czeczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998). En la cepa 042 de EAEC la adhesina AAF/II es la responsable del fenotipo de adherencia agregativa (AA) el cual presenta esta cepa cuando entra en contacto con células eucariotas (Elias *et al.*, 1999). No obstante, esta adhesina también está involucrada en la agregación celular (Sheikh *et al.*, 2002). La biogénesis de la adhesina AAF/II requiere la expresión de dos operones, *aafDA* y *aafCB*, los cuales se expresan independientemente (Elias *et al.*, 1999; Sheikh *et al.*, 2002). La mayor subunidad de la adhesina AAF/II, la proteína AafA es indispensable en la formación de biofilms (Czeczulin *et al.*, 1997). La correcta expresión de estos dos operones requiere la activación por parte del regulador transcripcional AggR (Elias *et al.*, 1999) el cual se codifica, juntamente con los operones de la adhesina AAF/II, en el plásmido pAA2 (Elias *et al.*, 1999; Savarino *et al.*, 1994) (Fig. 4.31). La proteína Aap, conocida como dispersina, parece también estar involucrada en el proceso de agregación celular (Sheikh *et al.*, 2002). Por lo tanto decidimos estudiar el efecto de la mutación Δhha en la expresión de las proteínas AggR, AafA y Aap. Para poder estudiar la expresión de estas proteínas, decidimos insertar una etiqueta 3XFLAG en la región C-terminal de las tres proteínas en la cepa salvaje 042 y el respectivo mutante Δhha . Cultivos de las tres cepas fueron crecidos en medio líquido LB a 25°C y a 37°C en agitación constante de 200 rpm. No obstante, también se hicieron crecer las mismas cepas en medio líquido DMEMplus (DMEM glucosa 0,45%) en cultivo estático durante toda la noche a 37°C. Ha sido descrito que la máxima expresión de AggR tiene lugar en cultivos crecidos en estas condiciones (Sheikh *et al.*, 2001). Se recogieron las células a una D.O._{600nm} de 2,0 para los cultivos crecidos en LB y a una D.O._{600nm} de 0,8 para los cultivos crecidos en medio DMEMplus. Se procesaron los extractos celulares de acuerdo con el apartado 3.9.2 de materiales y métodos. Los mismos se analizaron por SDS-PAGE al 10, 12,5 y 15% para AggR::3xflag, AafA::3xflag, y Aap::3xflag, respectivamente. Posteriormente se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF para los ensayos de inmunodetección de acuerdo con el apartado 3.9.4.2 de materiales y métodos. Con respecto al activador transcripcional AggR, los

resultados obtenidos muestran una mayor expresión de este activador en el fondo genético *hha* en todas las condiciones ensayadas. Además la mayor expresión tiene lugar en LB a 37°C (Fig. 4.26). También se observa una mayor expresión de la fimbria AafA y de la dispersina Aap en el mutante Δhha en medio LB. Estos resultados están de acuerdo con la mayor expresión de AggR observada (Fig. 4.26). Es resaltable que la máxima expresión de AggR parece tener lugar en cultivos crecidos en medio LB a 37°C, mientras que la máxima expresión de AafA y Aap tiene lugar en cultivos crecidos en DMEMplus. Bajo estas condiciones la mutación Δhha parece no afectar la expresión de ambas proteínas (Fig. 4.26).

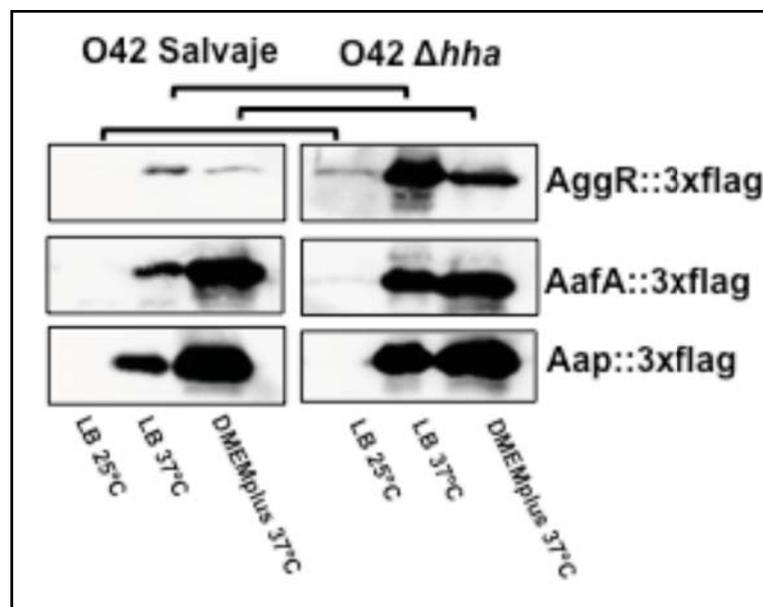


Figura 4.26. La pérdida de la proteína Hha resulta en una mayor expresión de las proteínas AggR, AafA y Aap en células crecidas en medio LB a 37°C. Inmunodetección de las proteínas AggR::3XFLAG, AafA::3XFLAG y Aap::3XFLAG a partir de extractos celulares obtenidos en medio LB a 25°C y a 37°C a una D.O._{600nm} de 2,0 o en medio DMEMplus a una D.O._{600nm} de 0,8. Las barras en negro facilitan la comparación entre las cepas al indicar los carriles correspondientes.

Considerando que el efecto observado de la mutación Δhha en la agregación celular tiene lugar a 37°C, una posible explicación para este fenotipo sería el aumento en la expresión de AafA o Aap, lo que desencadenaría la agregación celular. No obstante, (Sheikh *et al.*, 2002) describieron un efecto similar al observado en mutantes de la proteína Aap. Parece ser que la falta de esta proteína desencadena un colapso de

cargas entre la proteína AafA y la superficie celular, dado que Aap se localiza en la superficie celular y está asociada a la dispersión en procesos de formación de biofilms (Sheikh *et al.*, 2002).

Decidimos aprovechar la construcción AggR::3xflag en el plásmido pAA2 para conjugarlo a la cepa MG1655 y al mutante isogénico Δhha , y estudiar el efecto de las proteínas Hha en la agregación en la cepa MG1655. Los detalles de la conjugación se encuentran en el apartado 3.7.5 de materiales y métodos. Los transconjugantes de las cepas MG1655 y su derivado Δhha fueron seleccionados en presencia del marcador de la construcción 3XFLAG (Km 50 $\mu\text{g/ml}$). Se llevaron a cabo cultivos en medio líquido LB a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 2,0 y se recogieron alícuotas del cultivo para los ensayos de inmunodetección de acuerdo con los apartados 3.9.2 y 3.9.4 de materiales y métodos. Tras la inmunodetección utilizando anticuerpo monoclonal contra la etiqueta 3XFLAG, se observó el mismo patrón de expresión de AggR::3xflag al encontrado en *E. coli* 042, pero se observó una mayor expresión en la cepa *E. coli* MG1655 (Fig. 4.27).

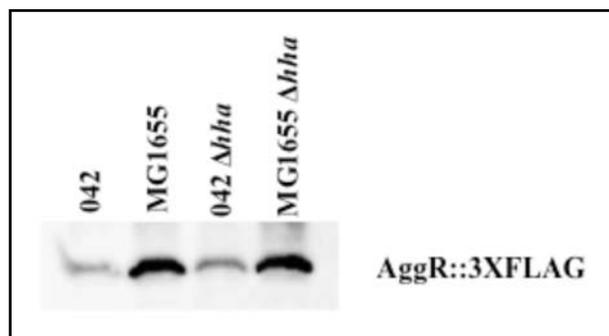


Figura 4.27. Expresión comparativa de la proteína AggR::3XFLAG codificada por el plásmido pAA2 en las cepas de *E. coli* EAEC 042 y MG1655. Inmunodetección utilizando el anticuerpo monoclonal contra la etiqueta 3XFLAG en extractos celulares de 042 AggR::3XFLAG y MG1655 AggR::3XFLAG crecidos en LB a 37°C.

4.3.4. La pérdida del activador transcripcional AggR en un fondo genético *hha*⁻ restaura el fenotipo salvaje de agregación celular

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el activador transcripcional AggR posee un papel central en la regulación de los operones constituyentes de la AAF/II (Sheikh *et al.*, 2002). La correcta expresión de este activador transcripcional

desencadena la expresión de las proteínas AafA, Aap y AatA, respectivamente (Elias *et al.*, 1999; Sheikh *et al.*, 2002). La proteína AatA es una porina tipo TolC que forma parte del sistema de secreción del tipo I el cual secreta la porina Aap a superficie celular (Sheikh *et al.*, 2002). Basándonos en los nuestros resultados que apuntan a una mayor expresión del activador AggR en un fondo genético Δhha , y consecuentemente a una mayor expresión de las proteínas AafA y Aap, decidimos combinar la mutación en los genes *aggR*, *aafA* y *aap* con la mutación Δhha para así determinar el nivel de regulación de *hha* en el loci AAF/II. Claramente al combinar la mutación *aggR::Km* en el fondo genético Δhha se observó una restauración en la agregación celular equivalente al observado a la cepa salvaje de 042 (Fig. 4.28A). A continuación se llevó a cabo la cuantificación de agregación celular de las cepas de 042; salvaje, Δhha , $\Delta aggR$, Δaap , $\Delta hha\Delta aggR$ y $\Delta hha\Delta aap$, crecidas en medio LB a 37°C de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos (Fig. 4.28B).

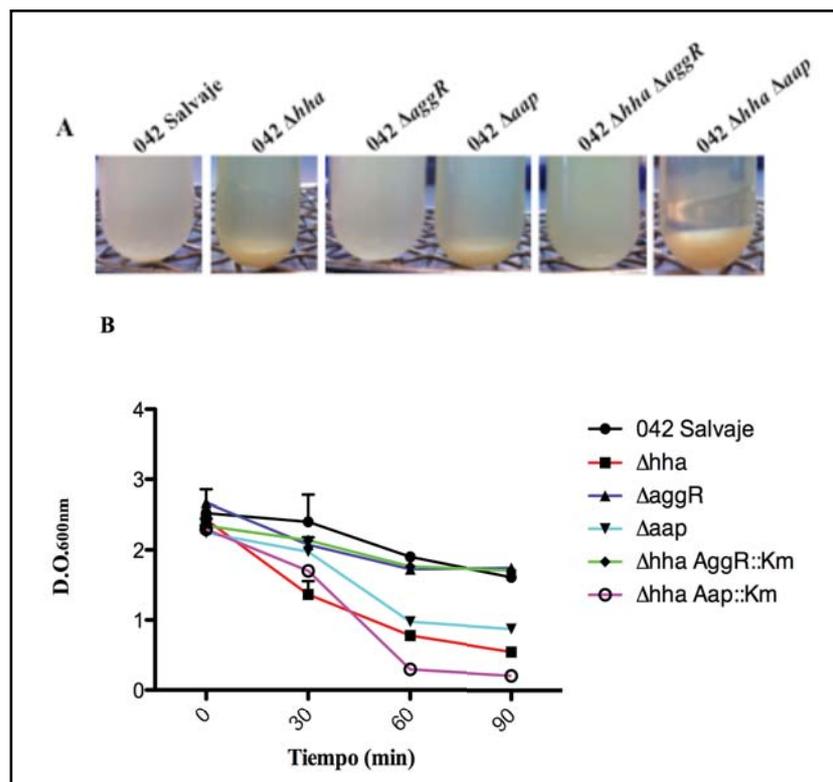


Figura 4.28. La pérdida de la proteína AggR en el fondo genético Δhha restaura el fenotipo salvaje de agregación celular. Cuantificación de agregación celular en cultivos crecidos a 37°C en medio LB. Se partió de una D.O._{600nm} de 2. A) Fotografía de los cultivos utilizados para la cuantificación de agregación celular. B) Cuantificación de la agregación celular de los respectivos cultivos. Los valores representados corresponden al promedio y variación estándar de tres experimentos independientes.

4.3.5. La pérdida de la proteína Hha desencadena una sobreexpresión del activador transcripcional AggR en *E. coli* EAEC 042

En el apartado anterior determinamos que la pérdida del regulador AggR en un fondo genético Δhha restaura el proceso de agregación celular de forma equivalente al observado en la cepa salvaje 042. En este apartado estudiamos si la presencia de la proteína AggR en *trans*, codificada por el plásmido pBADAggR, es capaz de complementar la mutación *aggR::km* en la cepa Δhha *aggR::km* y, por lo tanto, la cepa presenta un fenotipo de agregación celular idéntico al observado en el mutante Δhha (Fig. 4.29A). Se llevaron a cabo los ensayos de complementación en *trans* en medio LB o LB L-arabinosa 0,2% a 37°C. Se recogieron los cultivos a una D.O._{600nm} de 2,0 y se procedió a cuantificación de agregación celular de acuerdo con el apartado 3.10 de materiales y métodos.

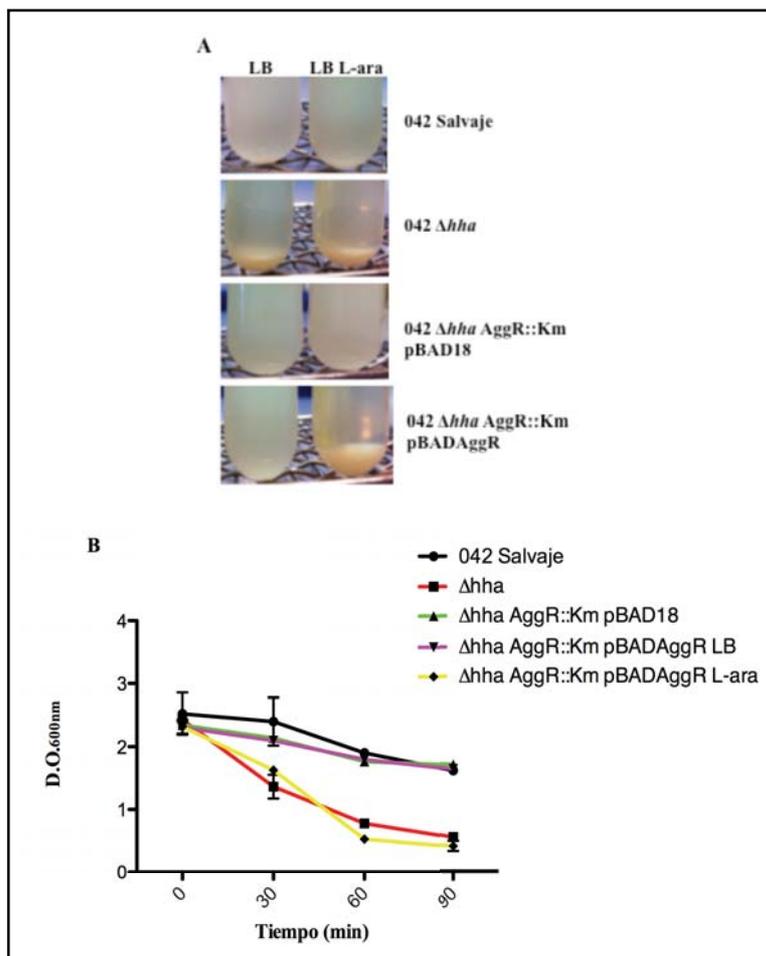


Figura 4.29. La complementación en *trans* de la proteína AggR por el plásmido pBADAggR, restaura el fenotipo de agregación celular en el doble mutante Δhha *aggR::km* de la cepa 042. Cuantificación de agregación celular en cultivos crecidos a 37°C en medio LB o LB L-arabinosa 0,2%. Las muestras se recolectaron a una D.O._{600nm} de 2. A) Imagen de los cultivos utilizados para la cuantificación de agregación celular. B) Cuantificación de la agregación celular de los

respectivos cultivos. Los valores representados corresponden al promedio y variación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos nos indican una mayor expresión del activador transcripcional AggR en un fondo genético Δhha cuando la cepa 042 crece en medio LB a 37°C. Esta mayor expresión podría estar llevando a una sobreproducción de las proteínas AafA e Aap y por lo tanto, desencadenando un fenotipo de agregación celular. Para confirmar esta hipótesis se llevó a cabo la sobreexpresión de la proteína AggR codificada por el plásmido pBADAggR en la cepa salvaje 042. Como es posible visualizar en la figura 4.30, la sobreproducción de este activador transcripcional resultó en un fenotipo de agregación celular similar al encontrado en el mutante Δhha .

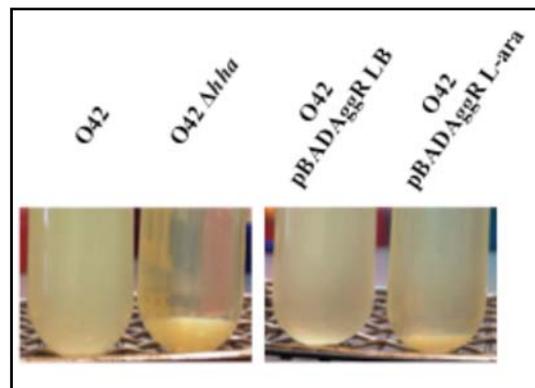


Figura 4.30. La sobreexpresión de AggR en *trans* por el plásmido pBADAggR en la cepa salvaje 042 desencadena un fenotipo de agregación celular similar al encontrado en el mutante Δhha .

4.3.6. Análisis transcriptómico de la cepa 042 y su respectivo mutante Δhha

A fin de complementar la información obtenida, se realizó un análisis transcriptómico global tanto de la cepa salvaje como del mutante *hha*, a partir de cultivos crecidos a 37 y 25°C. Por lo que respecta a los determinantes de virulencia del plásmido pAA2, los resultados del análisis transcriptómico corroboran los datos obtenidos valorando las proteínas con etiquetas FLAG y proporcionan adicionalmente más información. Los genes *aggR*, *aap* y *aafA* son reprimidos por temperatura, lo cual es coherente con la regulación dependiente de temperatura de determinantes de virulencia (Tabla 4.2). Además de éstos tres, el operón *aat*, que codifica para el aparato translocador de la dispersina, también está reprimido por temperatura (Fig. 4.31). En un fondo genético *hha*, existe derepresión de todos estos genes. Dicha derepresión es más

importante a 37°C que a 25°C, lo que indica que en la represión a 25°C la proteína Hha no es el factor más importante. En cambio, la proteína Hha ejerce un significativo efecto represor a 37°C, lo que sugiere que este elemento modulador, en respuesta a factores diferentes de la temperatura, continua limitando la expresión de factores de virulencia a baja temperatura.

Este efecto de la proteína Hha también se mantiene con otros factores de virulencia tales como la toxina Pet (Fig. 4.31). En cambio, los genes *ast*, que codifican para una enterotoxina termoestable, no muestran inducción a 37°C, y no se encuentran reguladas por Hha.

En un fondo genético Δhha , existe desrepresión por temperatura de los genes *aggR*, *aap* y *aafA*, lo que justifica el efecto fenotípico de la agregación celular y confirma que, también a elevada temperatura, Hha juega un papel modulando la expresión de dichos genes al margen de H-NS. Todos los datos obtenidos apuntan a *aggR* como el gen diana para Hha, lo que deberá ser confirmado en el futuro mediante estudios de interacción ADN-proteína.

Finalmente, el análisis detallado de la transcripción del gen *hha* a 37 y 25°C ha proporcionado un resultado novedoso: existe a 25°C una importante transcripción de la cadena antisentido la cual no se detecta a 37°C (Figs. 4.31A y B). Estos resultados sugieren una regulación y expresión diferencial del gen *hha* en función de la temperatura.

RESULTADOS

gen/operón*											
	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>aafC</i>	<i>aafA</i>	<i>aafB</i>	<i>aafD</i>	<i>aatB</i>	<i>aatP</i>	<i>aatA</i>	<i>aatD</i>	<i>aatC</i>
WT37/WT25	1,7	7	4,4	3	4	6,6	1,6	2,7	3,4	2	2,6
Hha37/WT37	2,9	1,75	1,5	2,2	1,6	3	4,2	4,7	4,1	3,7	4,4
Hha25/WT25	1,5	1,9	-	-	0,85	0,9	-	0,9	1,8	2,3	2,6
	<i>pet</i>	<i>astE</i>	<i>astC</i>	<i>astA</i>	<i>astD</i>	<i>astB</i>					
WT 37/WT 25	0,6	-5	-3,1	-3,7	-3,1	-4,5					
Hha37/WT37	1	-	-1,6	-	-	-					
Hha25/WT25	1,2	-	-	-	-	-					

Tabla 4.2. Efecto de la temperatura (37/25°C) y de la mutación Δhha sobre la expresión de determinantes de virulencia del plásmido pAA de *E. coli* 042. * Los valores presentados corresponden al *log fold change*, en rojo se indican los genes inducidos y en verde los genes reprimidos.

Plásmido pAA de *E. coli* 042

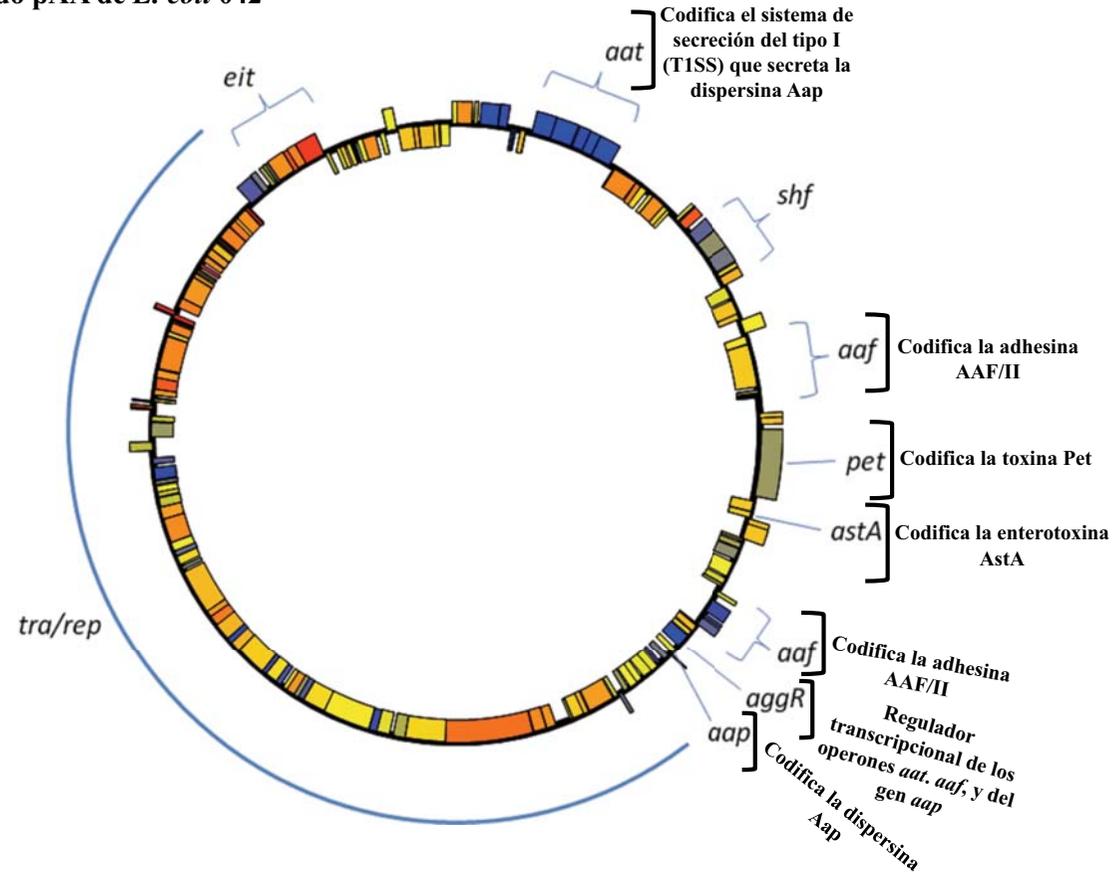


Figura 4.31. Representación del plásmido pAA de *E. coli* 042. Se destacan los genes/operones que presentaron sus niveles de expresión alterados (Tabla 4.2). Al lado derecho de cada gen/operón se indica su respectiva función.

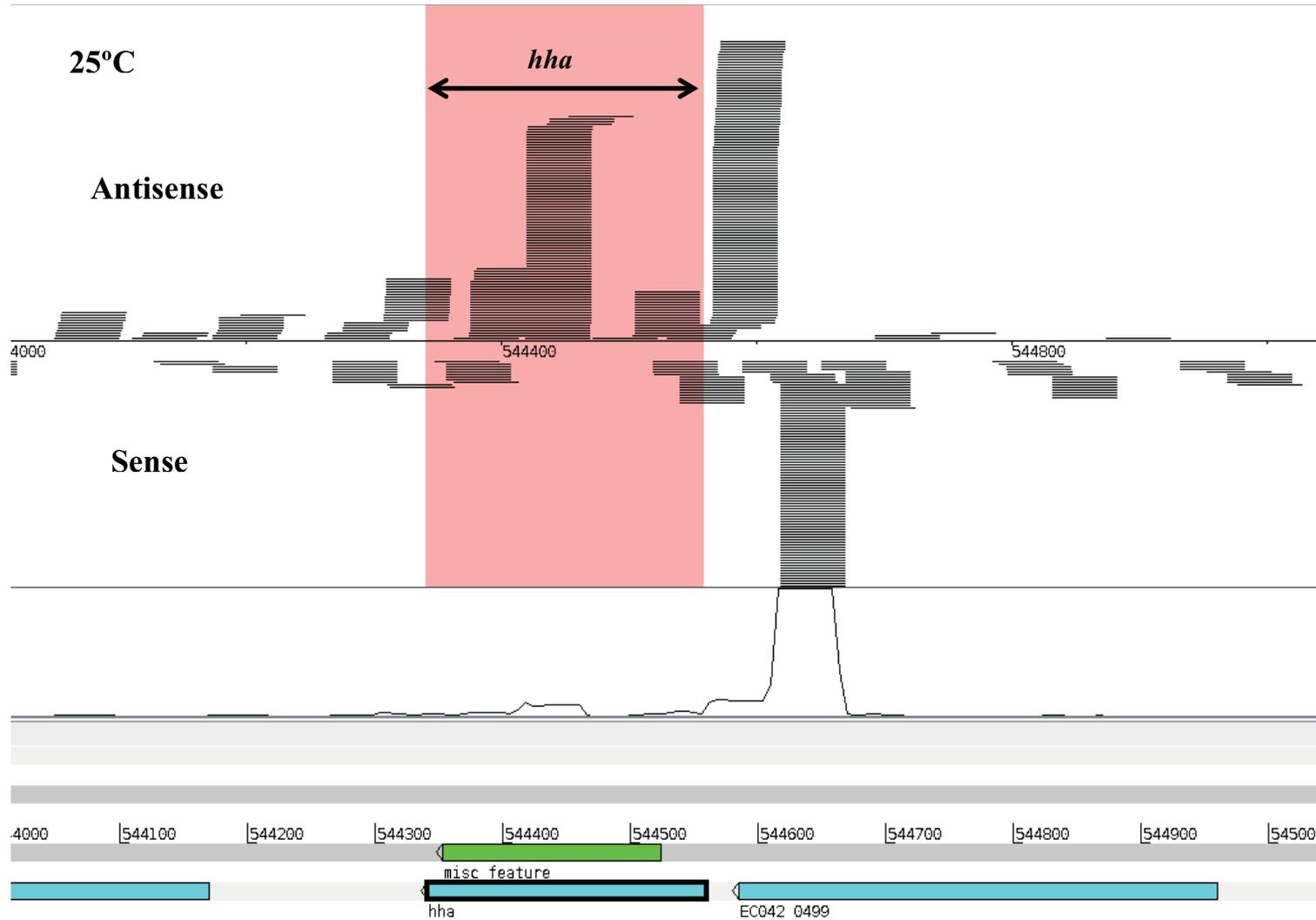


Figura 4.32A. Transcripción de las cadenas sentido (“sense”, parte inferior) y antisentido (“antisense”, parte superior) del gen *hha* a 25°C.

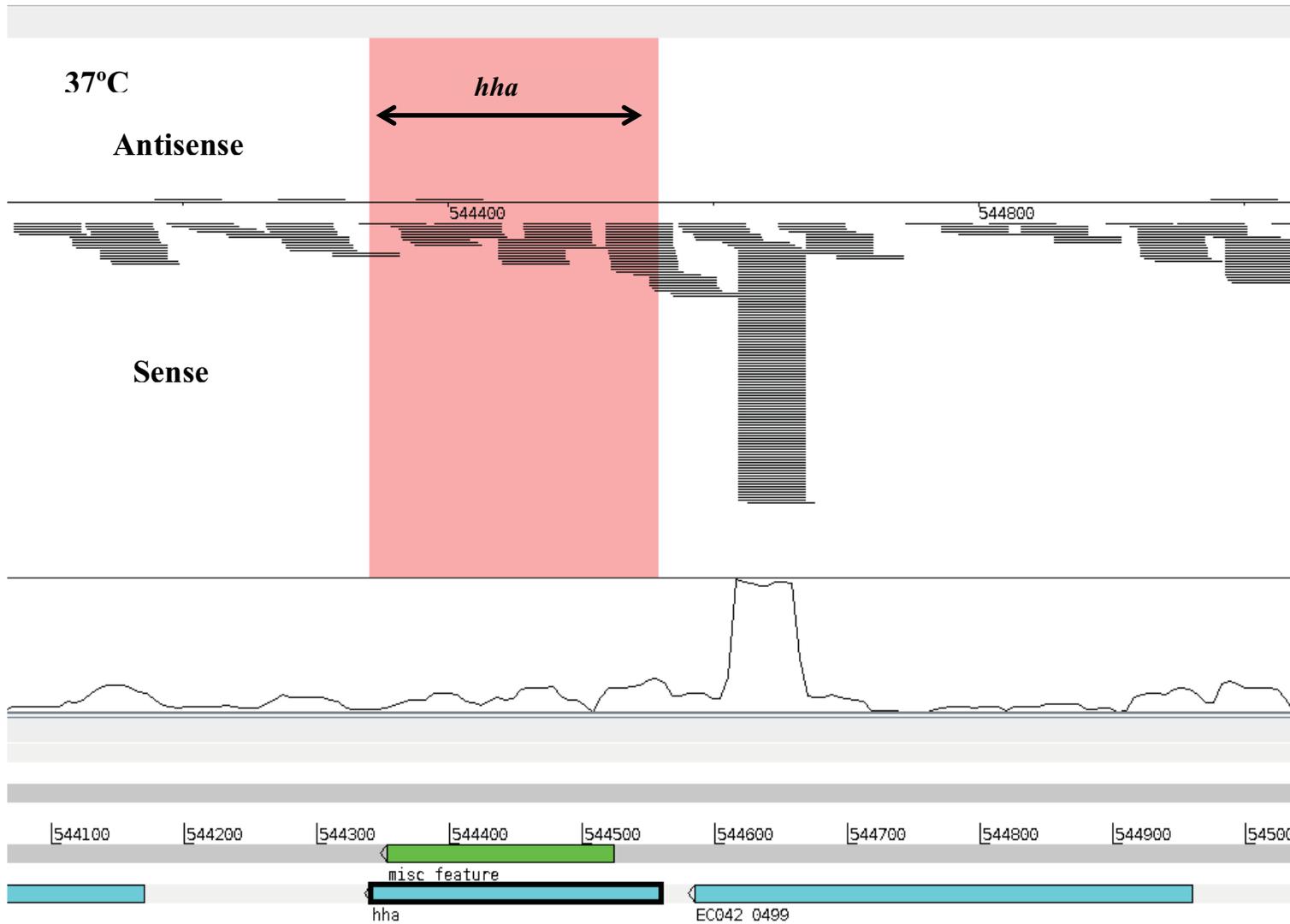


Figura 4.32B. Transcripción de las cadenas sentido (“sense”, parte inferior) y antisentido (“antisense”, parte superior) del gen *hha* a 37°C.

5. DISCUSIÓN

5.1. Regulación del gen *hilA* por las proteínas asociadas al nucleóide H-NS y Hha

Teniendo en cuenta que ya existía información acerca del papel de las proteínas asociadas a la cromatina H-NS y Hha en la regulación del gen *hilA*, la idea inicial en este trabajo era extrapolar el modelo ya caracterizado de regulación de *hilA* a *eilA*. Los trabajos preexistentes habían puesto de manifiesto un papel de H-NS/Hha reprimiendo *hilA* en condiciones de baja osmolaridad (Olekhovich & Kadner, 2007). No obstante, H-NS y Hha modulan *hilA* de forma diferente a elevada osmolaridad, y la razón de esto no se conocía. Además, al intentar clarificar este hecho y repetir los resultados ya publicados observamos que el modelo de regulación de *hilA* por H-NS y Hha era incompleto en otros aspectos, y decidimos clarificarlo. De hecho, en este trabajo se ha asociado la regulación de *hilA*, mediante estas proteínas, tanto a nivel de temperatura y osmolaridad como a la fase de crecimiento. La regulación del gen *hilA* en *S. Typhimurium* representa un ejemplo interesante de la amplia variedad de estímulos que pueden afectar a la regulación de la virulencia, y qué complejas pueden ser algunas cascadas reguladoras bacterianas.

Tanto la baja temperatura (25° C) como la baja osmolaridad representan condiciones no permisivas para la expresión de muchos operones de virulencia en patógenos tales como *Salmonella* o *E. coli*. El silenciamiento de tales determinantes por H-NS o H-NS/Hha es un proceso bien caracterizado (Ellison *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 2005; van Ulsen *et al.*, 1996). Los trabajos presentados en esta memoria ponen de manifiesto que H-NS y Hha reprimen *hilA* bajo un conjunto de condiciones ambientales y fisiológicas bien definido y, en consecuencia, estas proteínas reprimen indirectamente la isla SPI1. Baja osmolaridad, baja temperatura o una combinación de ambas determinan que H-NS/Hha silencien la expresión de *hilA*. Un trabajo reciente relaciona la temperatura, el pH y la fuerza iónica con la capacidad de H-NS de saltar entre dos estados diferentes de unión al ADN (Liu *et al.*, 2010). Condiciones de baja osmolaridad, bajo pH y baja temperatura causarían que H-NS polimerizase a lo largo de un monofilamento de ADN, sin plegarlo (modo *stiffening*) (Fig. 5.1A-C). Un aumento en el pH o la fuerza iónica provocarían una transición desde este estado de polimerización al estado clásico de formación de bucle (modo *bridging*), (Dame *et al.*, 2006) (Fig. 5.1D-F). En esta última conformación, H-NS sería insensible a efectos de temperatura. Estos datos justificarían las influencias conjunta y por separado

de la temperatura y osmolaridad sobre la capacidad de H-NS de reprimir la expresión génica, de la cual *hilA* es un buen ejemplo.

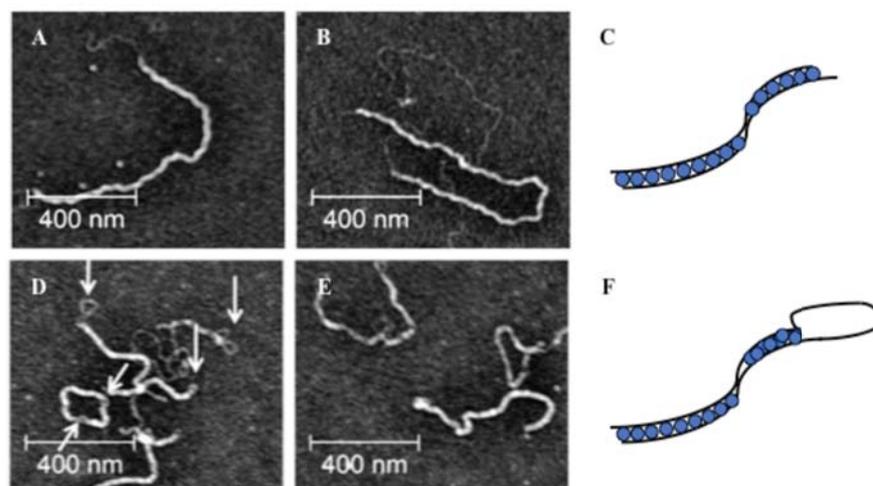


Figura. 5.1. Representación de las distintas conformaciones de ADN-H-NS en presencia o ausencia de iones Mg^{+2} . Imagen de microscopía de fuerza atómica (AFM) de los distintos complejos formados entre ADN-H-NS. A – C) En ausencia de iones Mg^{+2} la proteína H-NS se une al largo de la cadena de ADN adquiriendo la conformación *stiffening*. D – F) En presencia de iones Mg^{+2} la proteína H-NS se une a la cadena de ADN adquiriendo la conformación *bridging*. Las flechas en blanco indican las estructuras en forma de bucle formadas. Adaptado de (Liu *et al.*, 2010).

Los resultados presentados en esta Memoria ponen de manifiesto que, bajo condiciones permisivas de osmolaridad y temperatura, la fase de crecimiento juega un papel crítico para la expresión de *hilA* cuando las células de *Salmonella* crecen en medio LB. A 37° C se produce una inducción de la expresión de *hilA* cuando se alcanza la fase estacionaria. En esas condiciones, es aparente que la proteína H-NS deja de reprimir la expresión de *hilA*. Para intentar avanzar en el posible mecanismo por el que la entrada en fase estacionaria suprime la represión de H-NS sobre *hilA*, consideramos el proceso de anti-silenciamiento que suprime la represión de H-NS en varios operones bajo condiciones fisiológicas específicas (Stoebel *et al.*, 2008). Las proteínas RovA y Ler interfieren con el silenciamiento que lleva a cabo H-NS en *Y. enterocolitica* y *E. coli* respectivamente (Bustamante *et al.*, 2008; Heroven *et al.*, 2004). En *Salmonella*, el silenciamiento de H-NS sobre la SPI-2 es antagonizado por las proteínas HilD o SsrB

en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Bustamante *et al.*, 2008; Walthers *et al.*, 2007). IHF también antagoniza la represión que H-NS lleva a cabo. Un ejemplo clásico es el de la transcripción del promotor Pe del fago Mu, que es estimulado directamente por IHF (Krause & Higgins, 1986). También se ha puesto de manifiesto que IHF activa la transcripción de Pe indirectamente aliviando la represión de H-NS (van Ulsen *et al.*, 1996). Trabajos recientes refuerzan el papel de IHF eliminando el silenciamiento que H-NS ejerce en *Vibrio cholerae* (Stonehouse *et al.*, 2008) y en el operón *csgD* de *E. coli* (Ogasawara *et al.*, 2010).

En esta memoria se aportan evidencias experimentales que apoyan la idea de que IHF juega un papel esencial aliviando el silenciamiento de H-NS sobre *hilA*. Los resultados *in vivo* ponen de manifiesto que, bajo condiciones ambientales y fisiológicas específicas (condiciones permisivas), se requiere la función de IHF para la inducción de *hilA*. La interferencia con la actividad de H-NS compensa la ausencia de IHF en mutantes *ihf*. Los experimentos de retardo en gel sugieren que la unión de IHF a la región reguladora de *hilA* bloquearían la unión de H-NS y por tanto el silenciamiento causado por esta última. Finalmente, los resultados de transcripción *in vitro* ponen de manifiesto que IHF interfiere con la represión de H-NS sobre *hilA*. Todos estos resultados relacionan previos trabajos que muestran los papeles de H-NS modulando *hilA* (Olekhovich & Kadner, 2007) con los de IHF modulando la expresión de la virulencia en *Salmonella* en fase estacionaria (Mangan *et al.*, 2006). Haciendo crecer las células en medio LB con aireación, en esta memoria se pone de manifiesto que el silenciamiento de H-NS cesa al inicio de la fase estacionaria, y que se requiere IHF para aliviar dicho silenciamiento.

Resumiendo los resultados obtenidos en esta memoria sobre la regulación de *hilA*, parece claro que fuera del hospedador (condiciones de baja temperatura y/o baja osmolaridad), H-NS es un elemento clave silenciando la expresión no deseada de los genes de la isla SPI1. La proteína Hha potencia el efecto silenciador de H-NS sobre *hilA*. Dentro del hospedador, la combinación de factores ambientales modificados (temperatura y osmolaridad elevadas, entre otros) y la actividad de IHF suprimen el silenciamiento de H-NS sobre *hilA*. Posteriormente, la cascada reguladora que incluye HilD, HilC, RtsA, ppGpp y otros factores reguladores, en respuesta a muchas otras señales, determina los niveles de expresión de *hilA* (Fig. 5.2).

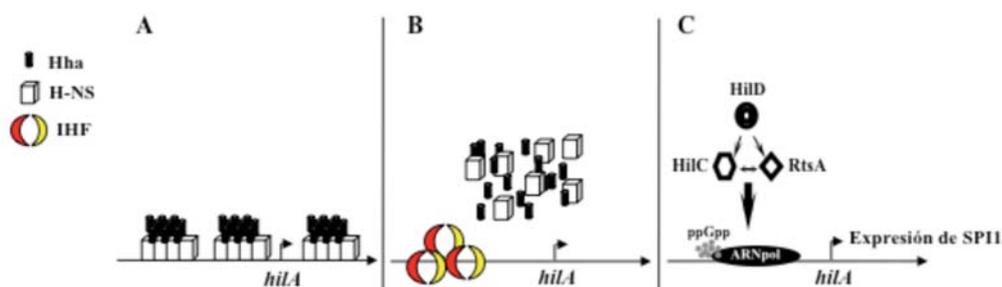


Figura. 5.2. Representación de la regulación de *hilA* de *Salmonella*. A) En condiciones no permisivas (baja temperatura, baja osmolaridad, fase exponencial de crecimiento) las proteínas H-NS/Hha reprimen la transcripción de *hilA*. B) En condiciones de expresión de *hilA* como alta temperatura, alta osmolaridad, fase estacionaria del crecimiento y la actividad de la proteína IHF suprimen el silenciamiento de H-NS sobre *hilA*. C) La cascada reguladora formada por las proteínas HilD, HilC y RtsA determinan los niveles de expresión de *hilA* y consecuentemente los determinantes de virulencia dependientes del mismo.

Un aspecto que en este punto queda abierto y que se trata también en el último apartado de la Memoria, es el hecho que en un mutante *hns* de la cepa SV5015 la proteína Hha reprime moderadamente la expresión de *hilA* en fase estacionaria. Los resultados presentados en la Memoria plantean bien que la proteína Hha puede modular *hilA* en cooperación con proteínas diferentes de H-NS (excluyéndose StpA) o bien que, bajo ciertas condiciones Hha es capaz de unirse al ADN sin requerimiento de otras proteínas y modulando la expresión génica. Esto se discute en el último apartado de esta sección.

5.2 Las proteínas EilA e YgeH, dos homólogas de HilA en la cepa EAEC 042 de *E. coli*

En los inicios del plan de trabajo nos planteamos estudiar y comparar las propiedades del regulador EilA con HilA. Tal y como se ha referido en la sección de resultados, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de la cepa 042 de *E. coli* permitió identificar también a la proteína YgeH como homóloga de HilA. Los estudios de complementación de la mutación *hilA* en *Salmonella* por las proteínas EilA e YgeH claramente ponen de manifiesto que las mismas son capaces de reemplazar

funcionalmente a HilA. Utilizando como indicador de la actividad de HilA la proteína SipA, no existen diferencias cuando la mutación *hilA* es complementada con HilA, EilA o YgeH. Además, en todos los casos la expresión de SipA se realiza vía InvF. Por tanto, estos reguladores transcripcionales que se encuentran respectivamente en *Salmonella* y en *E. coli* comparten un origen común y son funcionalmente intercambiables. En ambos casos modulan factores de virulencia, lo que sugiere que determinados sistemas de regulación de la virulencia tienen un origen común en *E. coli* y *Salmonella*.

Por lo que hace referencia a la regulación de la expresión de EilA y de YgeH en *E. coli*, los resultados obtenidos para ambos moduladores difieren notablemente del modelo de HilA. Esto es coherente, ya que los estilos de vida de *E. coli* y *Salmonella* difieren notablemente, y también sus estrategias de colonización y desarrollo de la patogénesis. Los resultados obtenidos para los dos moduladores de *E. coli* indican una mayor expresión en fase estacionaria, pero en ningún caso existen efectos claros ni de la temperatura, osmolaridad o pH. Probablemente, estos resultados hay que interpretarlos como que las condiciones de laboratorio que hemos utilizado no reproducen aquéllas *in vivo* en las que estos moduladores deban inducirse de forma significativa. También la proteína H-NS aparece como un represor transcripcional tanto de EilA como de YgeH pero, de forma diferente a HilA, ni los efectos transcripcionales de la mutación *hns* se correlacionan con unos factores ambientales determinados ni tampoco con la fase de crecimiento. Estos datos corroboran la hipótesis de que las condiciones reales *in vivo* de máxima inducción de estos dos moduladores no han sido simuladas por los cultivos que hemos realizado. Finalmente, también IHF parece tener un efecto diferente sobre la expresión de EilA y de YgeH. Mientras que en la expresión de EilA IHF no parece jugar un papel definido, en el caso de YgeH la proteína IHF puede también antagonizar el efecto de H-NS.

El hecho de que tanto EilA como YgeH puedan complementar un fenotipo *hilA* en *Salmonella* plantea que en la cepa 042 pueda producirse también un efecto de regulación cruzada de cada uno de estos reguladores sobre los genes diana del otro. Es importante resaltar aquí que homólogos de YgeH se encuentran presentes en otras cepas de *E. coli*, como la propia K12 o *E. coli* 0157:H7. Tal y como puede verse en la figura 1.21 del apartado introducción de esta tesis, existe un proceso evolutivo en diferentes cepas de *E. coli*, en las cuales los genes diana para YgeH difieren notablemente. Los estudios realizados en este trabajo con los genes *eivF* y *air* confirman la hipótesis de

efectos reguladores cruzados. La expresión de *eivF* parece depender tanto de YgeH, su activador transcripcional esperado, como de EilA. En cambio, *air* parece depender exclusivamente de EilA. Fuera ya del trabajo de esta memoria están planteados experimentos de análisis del efecto de los alelos *eilA*, *ygeH* y *eilA ygeH* sobre el patrón global de expresión génica de la cepa de *E. coli* 042. Estos datos nos permitirán evaluar con más precisión tanto los regulones de EilA e YgeH como el impacto de la regulación cruzada por las dos proteínas en sus respectivos regulones.

5.3 Un fenotipo inesperado: la mutación *hha* modifica la agregación celular y la formación de biofilm en la cepa 042 de *E. coli* cuando crece a 37°C

Si bien no formaba parte de los objetivos iniciales de este trabajo, el descubrimiento de forma accidental de que una mutación en el gen *hha* produce significativas alteraciones fenotípicas en la cepa 042 nos animó a investigar este resultado en más detalle. Adicionalmente al hecho de que se produjesen tales alteraciones fenotípicas, destaca el hecho de que el efecto es independiente de H-NS. Ya desde la caracterización inicial de la proteína Hha estudiando su papel como modulador de la expresión de la toxina alfa-hemolisina, su función se asoció a la de la proteína H-NS (Madrid *et al.*, 2002b; Nieto *et al.*, 2000). Estudios posteriores de diferentes grupos corroboraron este modelo (Ellison & Miller, 2006; Olekhovich & Kadner, 2006). Recientes estudios bioinformáticos demuestran que la presencia en plásmidos de alelos de *hns* suele venir acompañada de alelos de *hha* (Takeda *et al.*, 2011). No obstante, algunos autores indicaron que Hha era capaz de unirse al DNA de forma independiente a H-NS (Sharma & Zuerner, 2004) aunque los extractos conteniendo Hha no estaban libres de proteína H-NS contaminante. Trabajos posteriores sugirieron que, si bien Hha coregula con H-NS un número de genes, Hha podría regular específicamente otros (García-Contreras *et al.*, 2008). De hecho, dos resultados independientes en esta Memoria apoyan la hipótesis de que, en algunas circunstancias, Hha pueda regular la expresión génica de forma independiente a H-NS. Por una parte, los resultados correspondientes a la regulación de *hilA* por H-NS y Hha. En fase estacionaria, Hha sigue reprimiendo la expresión de H-NS, mientras que H-NS ya no presenta ningún efecto. En segundo lugar, los resultados referentes a la cepa de *E. coli* 042. Por tanto, el estudio del modelo del efecto del alelo *hha* sobre la agregación celular de *E. coli* 042 puede ayudar a entender mejor el papel regulador de la proteína Hha en ausencia de H-NS.

Los resultados obtenidos en esta Memoria permiten determinar la vía por la que la proteína Hha modifica la agregación celular de *E. coli* 042. El activador transcripcional AggR es requerido para la correcta expresión de los operones *aafDA* y *aafCB*, los cuales codifican para la biogénesis de la adhesina AAF/II, la cual es responsable del fenotipo de agregación celular y biofilm en la cepa de *E. coli* 042. Los resultados presentados en esta Memoria claramente correlacionan la mutación en el gen *hha* con un incremento en la expresión del activador AggR, lo cual conllevaría una mayor expresión de la adhesina AAF/II y el consiguiente aumento en la agregación celular. Además de una superior expresión de AggR en un mutante *hha*, también hemos podido demostrar que si se deleciona el gen *aggR*, la mutación *hha* ya no produce un incremento en la agregación celular.

Los datos transcriptómicos corroboran los obtenidos por proteómica, y añaden nueva información a la regulación de *aggR*, *aafA* y *aap*. Todos estos determinantes están regulados por temperatura, induciéndose a 37°C. Adicionalmente, Hha sigue reprimiendo la expresión de los tres a esta temperatura, lo que justifica que un genotipo Δhha redunde en una superior agregación celular, lo que se observa visualmente.

Todos los resultados anteriores plantean que el gen *aggR* es la diana de Hha en el proceso que controla la expresión de *aafA* y *aap* a 37°C. Experimentos de retardo en gel a 37°C han de confirmar si, en esas condiciones, Hha se une a la región reguladora de *aggR* para modular su expresión. Si esto se puede demostrar, el modelo de regulación de *aggR* por Hha extendería el rango de regulación por temperatura de las proteínas H-NS y Hha: los complejos heteroméricos H-NS/Hha modularían la expresión génica a baja temperatura, y complejos homoméricos Hha podrían en su caso extender la represión a 37°C, hasta que otros factores ambientales se combinaran con la temperatura. Es interesante destacar que, a 37°C, el efecto de la mutación *hha* sobre la expresión de las proteínas AafA y Aap se manifiesta cuando las células crecen en medio LB, pero no en medio DMEMplus (Fig. 4.26). Este ejemplo apoya la hipótesis de que, a 37°C, la represión que Hha ejerce sobre ciertos operones puede aliviarse en función de cambios ambientales (e.j. transición de medio LB a medio DMEMplus). La represión de *hila* a 37°C representa un modelo parecido a *aggR*, y apoya esta hipótesis.

Finalmente, la utilización del protocolo de secuenciación de alta resolución del genoma de *E. coli* 042 nos ha permitido obtener un resultado inesperado: la transcripción del gen *hha* sigue dos patrones diferentes en función de la temperatura.

Mientras que a 37°C la transcripción tiene lugar fundamentalmente en la cadena codificante, a 25°C se produce también una importante transcripción en la cadena antisentido, lo que podría interpretarse como que, a baja temperatura se expresa menos el gen *hha*. Estudios anteriores (Mouriño *et al.*, 1998) pusieron de manifiesto que la expresión del gen *hha* se incrementa tanto en fase exponencial como a elevada osmolaridad, pero el efecto de la temperatura no se había considerado hasta ahora. Si bien esto se ha de confirmar cuantificando la proteína Hha a alta y baja temperatura, una superior expresión de Hha a 37°C sería consistente con el papel que los resultados de este trabajo atribuyen a Hha como modulador de la expresión génica a 37°C en *E. coli* 042.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de este trabajo se resumen a continuación:

- 1) El regulador transcripcional de la isla SPI1 de *Salmonella*, la proteína HilA, se induce en fase estacionaria en cultivos crecidos en medio LB a 37°C.
- 2) Las proteínas H-NS y Hha reprimen la expresión de *hilA* bajo un conjunto de condiciones ambientales.
 - 2.1) Bajo condiciones las cuales simularían las condiciones ambientales, es decir, cultivos crecidos a 25°C en medio LB, H-NS juega el papel predominante en la represión de *hilA*. Hha potencia la represión de H-NS.
 - 2.2.) Bajo condiciones las cuales simularían el ambiente de un hospedador, es decir, cultivos crecidos a 37°C en medio LB, H-NS deja de actuar y tiene lugar la inducción de *hilA* en fase estacionaria.
- 3) La proteína IHF antagoniza el efecto represor de H-NS en la expresión de *hilA* en fase estacionaria a 37°C.
- 4) Las proteínas homólogas de HilA encontradas en la cepa de *E. coli* 042, EilA e YgeH, son capaces de complementar el fenotipo *hilA*⁻ en *S. Typhimurium*.
- 5) La activación de proteínas efectoras por parte de las proteínas EilA e YgeH en *S. Typhimurium* parece tener lugar de la misma manera que HilA, es decir, a través de InvF.
- 6) Los resultados de regulación transcripcional de los genes *eilA* e *ygeH* indican que H-NS silencia dichos genes, y los ensayos de EMSA apoyan la hipótesis.
- 7) Existe una regulación cruzada entre las islas de patogenicidad ETT2 y *eip* del patotipo de *E. coli* 042. La proteína EilA parece poder activar la expresión de EivF en ausencia de la proteína YgeH.

8) El fenotipo de agregación celular observado en el mutante *hha* en la cepa de *E. coli* 042 es dependiente de temperatura. Únicamente se observa a 37°C.

9) El fenotipo de agregación celular observado en el mutante *hha* es dependiente de la proteína AggR.

10) La pérdida de la proteína Hha desencadena la sobreexpresión de la proteína AggR lo que a su vez desencadena el fenotipo de agregación celular.

11) Tanto el modelo de la expresión de *hilA* en células de *Salmonella* crecidas en medio LB a 37°C y que alcanzan la fase estacionaria como el modelo la agregación celular de *E. coli* 042 a 37°C en mutantes *hha* sugieren que la proteína Hha juega un papel represor de la virulencia a 37°C independientemente de la proteína H-NS.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aberg, A., Shingler, V. & Balsalobre, C. (2008).** Regulation of the *fimB* promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA *in vivo*. *Mol Microbiol* **67**, 1223–1241.
- Agranoff, D. & Krishna, S. (2004).** Metal ion transport and regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* **9**, 2996–3006.
- Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J. & Hasnain, S. E. (2008).** Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol* **6**, 387–394.
- Ahmer, B. M., van Reeuwijk, J., Watson, P. R., Wallis, T. S. & Heffron, F. (1999).** *Salmonella* *SirA* is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* **31**, 971–982.
- Altier, C. (2005).** Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**, 85–92.
- Anders, S. & Huber, W. (2010).** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**:R106 doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- Arold, S.T., Leonard, P.G., Parkinson, G. N. & Ladbury, J. E. (2010).** H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 15728–15732.
- Arfin, S. M., Long, A. D., Ito, E. T., Toller, L., Riehle, M. M., Paegle, E. S. & Hatfield, G. W. (2000).** Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* **275**, 29672–29684.
- Atlung, T. & Hansen, F. G. (2002).** Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 1843–1850.
- Audia, J. P. & Foster, J. W. (2003).** Acid shock accumulation of sigma S in *Salmonella enterica* involves increased translation, not regulated degradation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**, 17–28.
- Azam, T. A., Hiraga, S. & Ishihama, A. (2000).** Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* **5**, 613–626.
- Azam, T. A. & Ishihama, A. (1999).** Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**, 33105–33113.
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. & Drolet, M. (2004).** RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**, 198–211.
- Badaut, C., Williams, R., Arluison, V., Bouffartigues, E., Robert, B., Buc, H. & Rimsky, S. (2002).** The degree of oligomerization of the H-NS nucleoid structuring protein is related to specific binding to DNA. *J Biol Chem* **277**, 41657–41666.
- Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C. A. (1995).** *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**, 715–727.
- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. (1996).** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703–714.
- Balsalobre, C., Juárez, A., Madrid, C., Mouriño, M., Prenafeta, A. & Muñoz, F. J. (1996).** Complementation of the *hha* mutation in *Escherichia coli* by the *ymoA* gene from *Yersinia enterocolitica*: dependence on the gene dosage. *Microbiology (Reading, Engl)* **142 (Pt 7)**, 1841–1846.
- Baños, R. C., Martínez, J., Polo, C., Madrid, C., Prenafeta, A. & Juárez, A. (2011).**

- The *yfeR* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium encodes an osmoregulated LysR-type transcriptional regulator. *FEMS Microbiol Lett* **315**, 63–71.
- Baños, R. C., Pons, J. I., Madrid, C. & Juárez, A. (2008).** A global modulatory role for the *Yersinia enterocolitica* H-NS protein. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**, 1281–1289.
- Baños, R. C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C. & Juárez, A. (2009).** Differential Regulation of Horizontally Acquired and Core Genome Genes by the Bacterial Modulator H-NS. *PLoS Genet* **5**, e1000513. Public Library of Science.
- Baudry, B., Savarino, S. J., Vial, P., Kaper, J. B. & Levine, M. M. (1990).** A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J Infect Dis* **161**, 1249–1251.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L. & Jones, B. D. (2003).** HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**, 1295–1305.
- Baxter, M. A. & Jones, B. D. (2005).** The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**, 1377–1385.
- Becker, N. A., Kahn, J. D. & Maher, L. J. (2007).** Effects of nucleoid proteins on DNA repression loop formation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **35**, 3988–4000.
- Bernier, C., Gounon, P. & Le Bouguéneq, C. (2002).** Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun* **70**, 4302–4311.
- Bertin, P., Benhabiles, N., Krin, E., Laurent-Winter, C., Tendeng, C., Turlin, E., Thomas, A., Danchin, A. & Brasseur, R. (1999).** The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **31**, 319–329.
- Bertin, P., Hommais, F., Krin, E., Soutourina, O., Tendeng, C., Derzelle, S. & Danchin, A. (2001).** H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism. *Biochimie* **83**, 235–241.
- Bijlsma, J. J. E., Waidner, B., Vliet, A. H. M. V., Hughes, N. J., Häg, S., Bereswill, S., Kelly, D. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Kist, M. & Kusters, J. G. (2002).** The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* **70**, 606–611.
- Blanc-Potard, A. B. & Groisman, E. A. (1997).** The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**, 5376–5385.
- Bloch, V., Yang, Y., Margeat, E., Chavanieu, A., Augé, M. T., Robert, B., Arold, S., Rimsky, S. & Kochoyan, M. (2003).** The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nat Struct Biol* **10**, 212–218.
- Boddicker, J. D., Knosp, B. M. & Jones, B. D. (2003).** Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* **185**, 525–533.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. & Falkow, S. (1977).** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95–113.
- Böhme, K., Steinmann, R., Kortmann, J., Seekircher, S., Heroven, A. K., Berger,**

- E., Pisano, F., Thiermann, T., Wolf-Watz, H., & other authors. (2012).** Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* **8**, e1002518.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. & Buc, H. (1989).** Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO J* **8**, 4289–4296.
- Bradley, M. D., Beach, M. B., de Koning, A. P. J., Pratt, T. S. & Osuna, R. (2007).** Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology (Reading, Engl)* **153**, 2922–2940.
- Brodsky, I. E., Ernst, R. K., Miller, S. I. & Falkow, S. (2002).** mig-14 is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **184**, 3203–3213.
- Browning, D. F., Grainger, D. C. & Busby, S. J. (2010).** Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* **13**, 773–780.
- Broyles, S. S. & Pettijohn, D. E. (1986).** Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol* **187**, 47–60.
- Bullas, L. R. & Ryu, J. I. (1983).** *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J Bacteriol* **156**, 471–474.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376–379.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. & Puente, J. L. (2008).** HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14591–14596.
- Carmona, M., Balsalobre, C., Muñoa, F., Mouriño, M., Jubete, Y., la Cruz, de, F. & Juárez, A. (1993).** *Escherichia coli* *hha* mutants, DNA supercoiling and expression of the haemolysin genes from the recombinant plasmid pANN202-312. *Mol Microbiol* **9**, 1011–1018.
- Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J. & Boiteux, S. (1995).** HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J Biol Chem* **270**, 10291–10296.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. & Foster, J. W. (1999).** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3525–3535.
- Chaudhuri, R. R., Sebahia, M., Hobman, J. L., Webber, M. A., Leyton, D. L., Goldberg, M. D., Cunningham, A. F., Scott-Tucker, A., Ferguson, P. R., & other authors. (2010).** Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PLoS ONE* **5**, e8801.
- Chen, S. & Calvo, J. M. (2002).** Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J Mol Biol* **318**, 1031–1042.
- Cherepanov, P. P. & W, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14.
- Cho, B.-K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S. & Palsson, B. Ø. (2008a).** Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 19462–19467.
- Cho, B.-K., Knight, E. M., Barrett, C. L. & Palsson, B. Ø. (2008b).** Genome-wide

- analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Res* **18**, 900–910.
- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. & Falkow, S. (1998).** Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**, 175–188.
- Claret, L. & Rouviere-Yaniv, J. (1997).** Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J Mol Biol* **273**, 93–104.
- Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L. & Hirst, B. H. (1994).** Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* **145**, 543–552.
- Coburn, B., Grassl, G. A. & Finlay, B. B. (2007).** *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* **85**, 112–118.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110–2114.
- Coker, C., Bakare, O. O. & Mobley, H. L. (2000).** H-NS is a repressor of the *Proteus mirabilis* urease transcriptional activator gene *ureR*. *J Bacteriol* **182**, 2649–2653.
- Collazo, C. M. & Galán, J. E. (1997).** The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review. *Gene* **192**, 51–59.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F. & Finlay, B. B. (2005).** Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17460–17465.
- Cornelis, G. R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M. P., Vanooteghem, J. C. & Michiels, T. (1991).** *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol* **5**, 1023–1034.
- Craig, N. L. & Nash, H. A. (1984).** *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* **39**, 707–716.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G. D. & Calvo, J. M. (1995).** A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol* **177**, 4872–4880.
- Czczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1997).** Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**, 4135–4145.
- Czczulin, J. R., Whittam, T. S., Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1999).** Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**, 2692–2699.
- Dame, R. T. (2005).** The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* **56**, 858–870.
- Dame, R. T., Noom, M. C. & Wuite, G. J. L. (2006).** Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**, 387–390.
- Darwin, K. H. & Miller, V. L. (1999).** InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 4949–4954.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6640–6645.
- Daubin, V., Lerat, E. & Perrière, G. (2003).** The source of laterally transferred genes

- in bacterial genomes. *Genome Biol* **4**, R57.
- Dersch, P., Schmidt, K. & Bremer, E. (1993).** Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol Microbiol* **8**, 875–889.
- Dillon, S. C. & Dorman, C. J. (2010).** Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* **8**, 185–195.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004).** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414–424.
- Dorman, C. J. (1991).** DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect Immun* **59**, 745–749.
- Dorman, C. J., Hinton, J. C. & Free, A. (1999).** Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* **7**, 124–128.
- Dorman, C. J., Ni Bhriain, N. & Higgins, C. F. (1990).** DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**, 789–792.
- Dorman, C. J. (2004).** H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**, 391–400.
- Dorman, C. J. (2009).** Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv Appl Microbiol* **67**, 47–64.
- Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H. & Bäumler, A. J. (2005).** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**, 196–211.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127–6145.
- Drolet, M. (2006).** Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**, 723–730.
- Eichelberg, K. & Galán, J. E. (1999).** Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and *hilA*. *Infect Immun* **67**, 4099–4105.
- Elias, W. P., Czczulin, J. R., Henderson, I. R., Trabulsi, L. R. & Nataro, J. P. (1999).** Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 1779–1785.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2005).** HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**, 691–705.
- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A. & Slauch, J. M. (2002).** Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**, 153–161.
- Ellermeier, C. D. & Slauch, J. M. (2003).** RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **185**, 5096–5108.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2007).** Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**, 24–29.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008).** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476–

- 486.
- Elliott, T. & Geiduschek, E. P. (1984).** Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a “-35” region. *Cell* **36**, 211–219.
- Ellison, D. W. & Miller, V. L. (2006).** H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**, 5101–5112.
- Ellison, D. W., Young, B., Nelson, K. & Miller, V. L. (2003).** YmoA negatively regulates expression of invasins from *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **185**, 7153–7159.
- Elwell, L. P. & Shipley, P. L. (1980).** Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Annu Rev Microbiol* **34**, 465–496.
- Ernst, A., Reich, S. & Böger, P. (1990).** Modification of dinitrogenase reductase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* due to C starvation and ammonia. *J Bacteriol* **172**, 748–755.
- Eslava, C., Navarro-Garcia, F., Czeczulin, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A. & Nataro, J. P. (1998).** Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**, 3155–3163.
- Esposito, D., Petrovic, A., Harris, R., Ono, S., Eccleston, J. F., Mbabaali, A., Haq, I., Higgins, C. F., Hinton, J. C. D., & other authors. (2002).** H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J Mol Biol* **324**, 841–850.
- Fahlen, T. F., Wilson, R. L., Boddicker, J. D. & Jones, B. D. (2001).** Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* **183**, 6620–6629.
- Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1996).** Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol Microbiol* **19**, 965–975.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. & Gualerzi, C. O. (1998).** Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* **17**, 7033–7043.
- Falconi, M., Higgins, N. P., Spurio, R., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1993).** Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Mol Microbiol* **10**, 273–282.
- Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E. & Colonna, B. (2001).** Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **42**, 439–452.
- Fass, E. & Groisman, E. A. (2009).** Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**, 199–204.
- Feng, X., Oropeza, R. & Kenney, L. J. (2003).** Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**, 1131–1143.
- Fierer, J. & Guiney, D. G. (2001).** Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* **107**, 775–780.
- Filiatrault, M. J., Picardo, K. F., Ngai, H., Passador, L. & Iglewski, B. H. (2006).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infect Immun* **74**, 4237–4245.
- Fink, R. C., Evans, M. R., Porwollik, S., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Troxell, B., Libby, S. J., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2007).** FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica*

- serovar Typhimurium (ATCC 14028s). *J Bacteriol* **189**, 2262–2273.
- Forns, N., Baños, R. C., Balsalobre, C., Juárez, A. & Madrid, C. (2005a).** Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J Bacteriol* **187**, 3950–3959.
- Forns, N., Juárez, A. & Madrid, C. (2005b).** Osmoregulation of the HtrA (DegP) protease of *Escherichia coli*: an Hha-H-NS complex represses HtrA expression at low osmolarity. *FEMS Microbiol Lett* **251**, 75–80.
- Fortune, D. R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2006).** Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **74**, 331–339.
- Foster, J. W. & Hall, H. K. (1990).** Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**, 771–778.
- Foster, J. (2004).** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*.
- Free, A. & Dorman, C. J. (1995).** Coupling of *Escherichia coli* *hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol Microbiol* **18**, 101–113.
- Gal-Mor, O. & Finlay, B. B. (2006).** Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* **8**, 1707–1719.
- Galán, J. E. (2001).** *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 53–86.
- Galán, J. E. & Curtiss, R. (1990).** Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* **58**, 1879–1885.
- García-del Portillo, F., Foster, J. W. & Finlay, B. B. (1993).** Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**, 4489–4492.
- García-Contreras, R., Zhang, X.-S., Kim, Y. & Wood, T. K. (2008).** Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. *PLoS ONE* **3**, e2394.
- Garmendia, J., Beuzón, C. R., Ruiz-Albert, J. & Holden, D. W. (2003).** The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology (Reading, Engl)* **149**, 2385–2396.
- Geissmann, T. A. & Touati, D. (2004).** Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**, 396–405.
- Genco, C. A. & Dixon, D. W. (2001).** Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**, 1–11.
- Germani, Y., Minssart, P., Vohito, M., Yassibanda, S., Glaziou, P., Hocquet, D., Berthélémy, P. & Morvan, J. (1998).** Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 1008–1014.
- Godessart, N., Muñoz, F. J., Regue, M. & Juárez, A. (1988).** Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid-encoded haemolysin in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **134**, 2779–2787.
- Goodrich, J. A., Schwartz, M. L. & McClure, W. R. (1990).** Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res* **18**, 4993–5000.
- Goyard, S. & Bertin, P. (1997).** Characterization of BpH3, an H-NS-like protein in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **24**, 815–823.

- Göransson, M., Sondén, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K. & Uhlin, B. E. (1990). Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**, 682–685.
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835–1842.
- Gross, C. & Neidhardt, F. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ... Molecular Biology.
- Guiney, D. (1997). Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *Journal of Clinical Investigation*.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121–4130.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. & Goebel, W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* **8**, 213–225.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**, 1089–1097.
- Hales, L. M., Gumpert, R. I. & Gardner, J. F. (1994). Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites. *J Bacteriol* **176**, 2999–3006.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Meth Enzymol* **204**, 63–113.
- Haniford, D. B. (2006). Transpososome dynamics and regulation in Tn10 transposition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 407–424.
- Hansen-Wester, I. & Hensel, M. (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**, 549–559.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53–66.
- Harrington, S. M., Dudley, E. G. & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 12–18.
- Harrison, E. & Brockhurst, M. A. (2012). Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol*.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., & other authors. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**, 11–22.
- Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hentschel, U., Govantes, F., Hanna, P. C. & Mahan, M. J. (1999). Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. *J Bacteriol* **181**, 799–807.
- Henderson, I. R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F. & Nataro, J. P. (1999a). Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**, 5587–5596.
- Henderson, I. R., Hicks, S., Navarro-Garcia, F., Elias, W. P., Philips, A. D. & Nataro, J. P. (1999b). Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect Immun* **67**, 5338–5344.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter

- story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692–744.
- Hensel, M. (2000).** *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**, 1015–1023.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C. & Holden, D. W. (1998).** Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**, 163–174.
- Hensel, M. (2004).** Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**, 95–102.
- Heroven, A. K., Nagel, G., Tran, H. J., Parr, S. & Dersch, P. (2004).** RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **53**, 871–888.
- Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. & Bremer, E. (1988).** A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**, 569–584.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A. & Bertin, P. (2001).** Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**, 20–36.
- Hong, K. H. & Miller, V. L. (1998).** Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol* **180**, 1793–1802.
- Huertas, P. & Aguilera, A. (2003).** Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* **12**, 711–721.
- Hulton, C. S., Seirafi, A., Hinton, J. C., Sidebotham, J. M., Waddell, L., Pavitt, G. D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. & Higgins, C. F. (1990).** Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**, 631–642.
- Humphries, A., Deridder, S. & Bäumlner, A. J. (2005).** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice. *Infect Immun* **73**, 5329–5338.
- Huppertz, H. I., Rutkowski, S., Aleksic, S. & Karch, H. (1997).** Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet* **349**, 1660–1662.
- Hurme, R., Berndt, K. D., Normark, S. J. & Rhen, M. (1997).** A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* **90**, 55–64.
- Hurme, R. & Rhen, M. (1998).** Temperature sensing in bacterial gene regulation--what it all boils down to. *Mol Microbiol* **30**, 1–6.
- Jackson, M. W., Silva-Herzog, E. & Plano, G. V. (2004).** The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol* **54**, 1364–1378.
- Jacquet, M., Cukier-Kahn, R., Pla, J. & Gros, F. (1971).** A thermostable protein factor acting on *in vitro* DNA transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **45**, 1597–1607.
- Johansson, J., Eriksson, S., Sondén, B., Wai, S. N. & Uhlin, B. E. (2001).** Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 2343–2347.
- Jones, B. D. & Falkow, S. (1996).** Salmonellosis: host immune responses and bacterial

- virulence determinants. *Annu Rev Immunol* **14**, 533–561.
- Jones, B. (2005).** *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43**, 110–117.
- Jouve, M., Garcia, M. I., Courcoux, P., Labigne, A., Gounon, P. & Le Bouguéneq, C. (1997).** Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect Immun* **65**, 4082–4089.
- Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C. D. & Dorman, C. J. (2004).** A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading, Engl)* **150**, 2037–2053.
- Klein, J. R., Fahlen, T. F. & Jones, B. D. (2000).** Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB*, and *orgC* genes. *Infect Immun* **68**, 3368–3376.
- Knodler, L. A., Celli, J., Hardt, W.-D., Vallance, B. A., Yip, C. & Finlay, B. B. (2002).** *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* **43**, 1089–1103.
- Koop, A. H., Hartley, M. E. & Bourgeois, S. (1987).** A low-copy-number vector utilizing beta-galactosidase for the analysis of gene control elements. *Gene* **52**, 245–256.
- Kortmann, J. & Narberhaus, F. (2012).** Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* **10**, 255–265.
- Krause, H. M. & Higgins, N. P. (1986).** Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor. *J Biol Chem* **261**, 3744–3752.
- Krulwich, T. A., Sachs, G. & Padan, E. (2011).** Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **9**, 330–343.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S. I. (1998).** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602–605.
- Kuhle, V. & Hensel, M. (2004).** Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2812–2826.
- La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1991).** Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10907–10911.
- Landeta, C., Davalos, A., Cevallos, M. A., Geiger, O., Brom, S. & Romero, D. (2011).** Plasmids with a Chromosome-Like Role in Rhizobia. *J Bacteriol* **193**, 1317–1326.
- Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C. O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C. L., & other authors. (2007).** High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**, 6330–6337.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. (2009).** Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**:R25 doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2002).** Intestinal short-chain

- fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* **46**, 1451–1464.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1997).** Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* **44**, 383–397.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S. & Falkow, S. (2000).** OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**, 771–781.
- Lee, C. A., Jones, B. D. & Falkow, S. (1992).** Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1847–1851.
- Lee, J.-W. & Helmann, J. D. (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485–499.
- Lim, S., Kim, B., Choi, H.-S., Lee, Y. & Ryu, S. (2006).** Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **41**, 33–42.
- Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D. & Ryu, S. (2007).** Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hile* repression. *Nucleic Acids Res* **35**, 1822–1832.
- Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. (1993).** Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**, 137–149.
- Liu, Q. & Richardson, C. C. (1993).** Gene 5.5 protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H-NS of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1761–1765.
- Liu, Y., Chen, H., Kenney, L. J. & Yan, J. (2010).** A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev* **24**, 339–344.
- Loströh, C. P., Bajaj, V. & Lee, C. A. (2000).** The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* **37**, 300–315.
- Loströh, C. P. & Lee, C. A. (2001).** The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* **3**, 1281–1291.
- López-Garrido, J. & Casadesús, J. (2010).** Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* **184**, 637–649.
- López-Garrido, J. & Casadesús, J. (2012).** Crosstalk between virulence loci: regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon. *PLoS ONE* **7**, e30499.
- Lucas, R. L. & Lee, C. A. (2001).** Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**, 2733–2745.
- Lucas, R. L., Loströh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L. & Lee, C. A. (2000).** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **182**, 1872–1882.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. & Hinton, J. C. D. (2006).** H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**, e81.
- Madrid, C., Balsalobre, C., García, J. & Juárez, A. (2007).** The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol Microbiol* **63**, 7–14.
- Madrid, C., Nieto, J. M. & Juárez, A. (2002a).** Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *Int J Med*

- Microbiol* **291**, 425–432.
- Madrid, C., Nieto, J. M., Paytubi, S., Falconi, M., Gualerzi, C. O. & Juárez, A. (2002b).** Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**, 5058–5066.
- Main-Hester, K. L., Colpitts, K. M., Thomas, G. A., Fang, F. C. & Libby, S. J. (2008).** Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **76**, 1024–1035.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. O., Hinton, J. C. D. & Dorman, C. J. (2006).** The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**, 1831–1847.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. & Finlay, B. B. (2000).** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**, 145–156.
- Massé, E., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2005).** Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 6962–6971.
- Maurelli, A. T. & Sansonetti, P. J. (1988).** Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2820–2824.
- May, G., Dersch, P., Haardt, M., Middendorf, A. & Bremer, E. (1990).** The *osmZ* (*bgly*) gene encodes the DNA-binding protein H-NS (H1a), a component of the *Escherichia coli* K12 nucleoid. *Mol Gen Genet* **224**, 81–90.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2001).** Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* **20**, 2131–2139.
- McLeod, S. M., Aiyar, S. E., Gourse, R. L. & Johnson, R. C. (2002).** The C-terminal domains of the RNA polymerase alpha subunits: contact site with Fis and localization during co-activation with CRP at the *Escherichia coli* proP P2 promoter. *J Mol Biol* **316**, 517–529.
- Ménard, L.-P., Lussier, J. G., Lépine, F., Paiva de Sousa, C. & Dubreuil, J. D. (2004).** Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr Purif* **33**, 223–231.
- Mikulskis, A. V. & Cornelis, G. R. (1994).** A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria. *Mol Microbiol* **11**, 77–86.
- Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbour NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. (1989).** A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5054–5058.
- Mills, D. M., Bajaj, V. & Lee, C. A. (1995).** A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* **15**, 749–759.
- Mojica, F. J. & Higgins, C. F. (1997).** *In vivo* supercoiling of plasmid and chromosomal DNA in an *Escherichia coli* *hns* mutant. *J Bacteriol* **179**, 3528–3533.
- Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W. W., Bader, M. W., De Smet, F., McClelland, M., Fang, F. C., De Moor, B., Vanderleyden, J. & Marchal, K. (2005).** Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Evol* **60**, 462–474.

- Moreira, L. de O., Andrade, A. F. B., Vale, M. D., Souza, S. M. S., Hirata, R., Asad, L. M. O. B., Asad, N. R., Monteiro-Leal, L. H., Previato, J. O. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2003).** Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5907–5913.
- Morgan, E., Campbell, J. D., Rowe, S. C., Bispham, J., Stevens, M. P., Bowen, A. J., Barrow, P. A., Maskell, D. J. & Wallis, T. S. (2004).** Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**, 994–1010.
- Morin, N., Tirling, C., Ivison, S. M., Kaur, A. P., Nataro, J. P. & Steiner, T. S. (2010).** Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**, 344–355.
- Morschhäuser, J., Uhlin, B. E. & Hacker, J. (1993).** Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet* **238**, 97–105.
- Mortazavi, A., Williams, B., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008).** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**, 621–628.
- Mouriño, M., Balsalobre, C., Madrid, C., Nieto, J. M., Prenafeta, A., Muñoa, F. J. & Juárez, A. (1998).** Osmolarity modulates the expression of the Hha protein from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **160**, 225–229.
- Mouriño, M., Muñoa, F., Balsalobre, C., Diaz, P., Madrid, C. & Juárez, A. (1994).** Environmental regulation of alpha-haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **16**, 249–259.
- Mousslim, C. & Groisman, E. A. (2003).** Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**, 335–344.
- Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R. & Ban, N. (2009).** The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* **459**, 726–730.
- Muffler, A., Fischer, D. & Hengge-Aronis, R. (1996).** The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **10**, 1143–1151.
- Mumm, J. P., Landy, A. & Gelles, J. (2006).** Viewing single lambda site-specific recombination events from start to finish. *EMBO J* **25**, 4586–4595.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. & Jahn, D. (2005).** Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**, 4187–4189.
- Narberhaus, F. (2010).** Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol* **7**, 84–89.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T. & Chowdhury, S. (2006).** RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 3–16.
- Nataro, J. P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S. J., Guers, L. D., Levine, M. M. & Tacket, C. O. (1995).** Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* **171**, 465–468.
- Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C. & Levine, M. M. (1992).** Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* **60**, 2297–2304.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. & Levine, M. M. (1987).** Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells.

- Pediatr Infect Dis J* **6**, 829–831.
- Nataro, J. P., Steiner, T. & Guerrant, R. L. (1998).** Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infect Dis* **4**, 251–261.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D. & Walker, K. (1994).** AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 4691–4699.
- Navarre, W. W., McClelland, M., Libby, S. J. & Fang, F. C. (2007).** Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev* **21**, 1456–1471.
- Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J. & Fang, F. C. (2006).** Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236–238.
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Luna, J., Sears, C. & Nataro, J. P. (2001).** Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. *Infect Immun* **69**, 1053–1060.
- Nieto, J. M., Carmona, M., Bolland, S., Jubete, Y., la Cruz, de, F. & Juárez, A. (1991).** The *hha* gene modulates haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 1285–1293.
- Nieto, J. M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J. L., Rodríguez, S. & Juárez, A. (2002).** Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J Bacteriol* **184**, 629–635.
- Nieto, J. M., Madrid, C., Prenafeta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M. & Juárez, A. (2000).** Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol Gen Genet* **263**, 349–358.
- Nieto, J. M., Prenafeta, A., Miquelay, E., Torrades, S. & Juárez, A. (1998).** Sequence, identification and effect on conjugation of the *rmoA* gene of plasmid R100-1. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 59–66.
- Nishino, K., Latifi, T. & Groisman, E. A. (2006).** Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**, 126–141.
- Nougayrède, J.-P., Fernandes, P. J. & Donnenberg, M. S. (2003).** Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**, 359–372.
- Nye, M. B., Pfau, J. D., Skorupski, K. & Taylor, R. K. (2000).** *Vibrio cholerae* H-NS silences virulence gene expression at multiple steps in the ToxR regulatory cascade. *J Bacteriol* **182**, 4295–4303.
- O Cróinín, T., Carroll, R. K., Kelly, A. & Dorman, C. J. (2006).** Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **62**, 869–882.
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H. & Rouviere-Yaniv, J. (2009).** The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS ONE* **4**, e4367.
- Ochman, H. & Groisman, E. A. (1994).** The origin and evolution of species differences in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *EXS* **69**, 479–493.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996).** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7800–7804.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010).**

- Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology (Reading, Engl)* **156**, 2470–2483.
- Okeke, I. N., Ojo, O., Lamikanra, A. & Kaper, J. B. (2003).** Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol* **41**, 4525–4530.
- Olekhovich, I. N. & Kadner, R. J. (2002).** DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 4148–4160.
- Olekhovich, I. N. & Kadner, R. J. (2006).** Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hila* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **357**, 373–386.
- Olekhovich, I. N. & Kadner, R. J. (2007).** Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* **189**, 6882–6890.
- Ono, S., Goldberg, M. D., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J. C. D. & Ladbury, J. E. (2005).** H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* **391**, 203–213.
- Owen-Hughes, T. A., Pavitt, G. D., Santos, D. S., Sidebotham, J. M., Hulton, C. S., Hinton, J. C. & Higgins, C. F. (1992).** The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**, 255–265.
- Pallen, M. J. & Gophna, U. (2007).** Bacterial flagella and Type III secretion: case studies in the evolution of complexity. *Genome Dyn* **3**, 30–47.
- Park, C. & Zhang, J. (2012).** High expression hampers horizontal gene transfer. *Genome Biol Evol* **4**, 523–532.
- Paytubi, S., García, J. & Juárez, A. (2011).** Bacterial Hha-like proteins facilitate incorporation of horizontally transferred DNA. *centeurjbiol* **6**, 879–886.
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N., Nieto, J. M., Balsalobre, C., Uhlin, B. E. & Juárez, A. (2004).** YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Mol Microbiol* **54**, 251–263.
- Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., & other authors. (2001).** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529–533.
- Pfeiffer, V., Sittka, A., Tomer, R., Tedin, K., Brinkmann, V. & Vogel, J. (2007).** A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Mol Microbiol* **66**, 1174–1191.
- Pflum, M. K. H. (2006, August).** H-NS gives invading DNA the silent treatment. *Nat Chem Biol* **2**, 400–401.
- Pizarro-Cerdá, J. & Tedin, K. (2004).** The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**, 1827–1844.
- Porwollik, S. & McClelland, M. (2003).** Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**, 977–989.
- Powell, B. S., Rivas, M. P., Court, D. L., Nakamura, Y. & Turnbough, C. L. (1994).** Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res* **22**, 5765–5766.
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. & Silhavy, T. J. (1996).** From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**, 911–917.
- Prouty, A. M. & Gunn, J. S. (2000).** *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* **68**, 6763–6769.
- Pul, U., Wurm, R. & Wagner, R. (2007).** The role of LRP and H-NS in transcription

- regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. *J Mol Biol* **366**, 900–915.
- Rankin, S., Isberg, R. R. & Leong, J. M. (1992).** The integrin-binding domain of invasin is sufficient to allow bacterial entry into mammalian cells. *Infect Immun* **60**, 3909–3912.
- Ren, C.-P., Beatson, S. A., Parkhill, J. & Pallen, M. J. (2005).** The Flag-2 locus, an ancestral gene cluster, is potentially associated with a novel flagellar system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 1430–1440.
- Ren, C.-P., Chaudhuri, R. R., Fivian, A., Bailey, C. M., Antonio, M., Barnes, W. M. & Pallen, M. J. (2004a).** The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition. *J Bacteriol* **186**, 3547–3560.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. & Wood, T. K. (2004b).** Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 515–524.
- Rhein, von, C., Bauer, S., Simon, V. & Ludwig, A. (2008).** Occurrence and characteristics of the cytolysin A gene in *Shigella* strains and other members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* **287**, 143–148.
- Riesenberg-Wilmes, M. R., Bearson, B., Foster, J. W. & Curtis, R. (1996).** Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**, 1085–1092.
- Rodríguez, E., Gaggero, C. & Laviña, M. (1999).** The structural gene for microcin H47 encodes a peptide precursor with antibiotic activity. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2176–2182.
- Rossiter, A. E., Browning, D. F., Leyton, D. L., Johnson, M. D., Godfrey, R. E., Wardius, C. A., Desvaux, M., Cunningham, A. F., Ruiz-Perez, F., & other authors. (2011).** Transcription of the plasmid-encoded toxin gene from enteroaggregative *Escherichia coli* is regulated by a novel co-activation mechanism involving CRP and Fis. *Mol Microbiol* **81**, 179–191.
- Sambrook, J. (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 volume set)*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sang, W. K., Oundo, J. O., Mwituria, J. K., Waiyaki, P. G., Yoh, M., Iida, T. & Honda, T. (1997).** Multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerging Infect Dis* **3**, 373–374.
- Santero, E., Hoover, T. R., North, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C. & Kustu, S. (1992).** Role of integration host factor in stimulating transcription from the sigma 54-dependent *nifH* promoter. *J Mol Biol* **227**, 602–620.
- Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S. & Guerry, P. (1993).** Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3093–3097.
- Savarino, S. J., Fox, P., Deng, Y. & Nataro, J. P. (1994).** Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J Bacteriol* **176**, 4949–4957.
- Schechter, L. M. & Lee, C. A. (2001).** AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**, 1289–1299.
- Schechter, L. M., Jain, S., Akbar, S. & Lee, C. A. (2003).** The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**, 5432–5435.

- Schmidt, H. & Hensel, M. (2004).** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**, 14–56.
- Schmieger, H. (1972).** Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**, 75–88.
- Schröder, O. & Wagner, R. (2000).** The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J Mol Biol* **298**, 737–748.
- Schröder, O. & Wagner, R. (2002).** The bacterial regulatory protein H-NS--a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol Chem* **383**, 945–960.
- Sharma, V. K. & Zuerner, R. L. (2004).** Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **186**, 7290–7301.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996).** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2593–2597.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. & Nataro, J. P. (2001).** Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 983–997.
- Sheikh, J., Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., Le Bouguéneq, C., Gounon, P., Phillips, A. & Nataro, J. P. (2002).** A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **110**, 1329–1337.
- Sheikh, J., Dudley, E. G., Sui, B., Tamboura, B., Suleman, A. & Nataro, J. P. (2006).** EilA, a HlaA-like regulator in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**, 338–350.
- Shimamura, T., Watanabe, S. & Sasaki, S. (1985).** Enhancement of enterotoxin production by carbon dioxide in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **49**, 455–456.
- Shindo, H., Iwaki, T., Ieda, R., Kurumizaka, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Morikawa, S., Nakamura, H. & Kuboniwa, H. (1995).** Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **360**, 125–131.
- Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M. & Coombes, B. K. (2007).** Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* **189**, 3669–3673.
- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85–96.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K. & Vogel, J. (2007).** The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **63**, 193–217.
- Smith, R. L., Kaczmarek, M. T., Kucharski, L. M. & Maguire, M. E. (1998).** Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: regulation of *mgtA* and *mgtCB* during invasion of epithelial and macrophage cells. *Microbiology (Reading, Engl)* **144** (Pt 7), 1835–1843.
- Smyth, C. P., Lundbäck, T., Renzoni, D., Siligardi, G., Bevil, R., Layton, M., Sidebotham, J. M., Hinton, J. C., Driscoll, P. C., & other authors. (2000).** Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Mol Microbiol* **36**, 962–972.
- Snyder, L. & Champness, W. (2007).** *Molecular Genetics of Bacteria, Third Edition (Snyder, Molecular Genetics of Bacteria)*, 3rd edn. ASM Press.
- Song, M., Kim, H.-J., Kim, E. Y., Shin, M., Lee, H. C., Hong, Y., Rhee, J. H., Yoon, H., Ryu, S., & other authors. (2004).** ppGpp-dependent stationary phase induction

- of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Biol Chem* **279**, 34183–34190.
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1997).** The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO J* **16**, 1795–1805.
- Stella, S., Falconi, M., Lammi, M., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (2006).** Environmental control of the *in vivo* oligomerization of nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **355**, 169–174.
- Stoebel, D. M., Free, A. & Dorman, C. J. (2008).** Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**, 2533–2545.
- Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R. K. & Skorupski, K. (2008).** Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **190**, 4736–4748.
- Svara, F. & Rankin, D. J. (2011).** The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. *BMC Evol Biol* **11**, 130.
- Swinger, K. K. & Rice, P. A. (2004).** IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 28–35.
- Takeda, T., Yun, C.-S., Shintani, M., Yamane, H. & Nojiri, H. (2011).** Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *Int J Evol Biol* **2011**, 685015.
- Tauschek, M., Gorrell, R. J., Strugnell, R. A. & Robins-Browne, R. M. (2002).** Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7066–7071.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbé, J. & Campoy, S. (2011).** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS ONE* **6**, e19711.
- Telang, S., Vimr, E., Mahoney, J. R., Law, I., Lundqvist-Gustafsson, H., Qian, M. & Eaton, J. W. (2001).** Strain-specific iron-dependent virulence in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **184**, 159–165.
- Tendeng, C., Soutourina, O. A., Danchin, A. & Bertin, P. N. (2003a).** MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology (Reading, Engl)* **149**, 3047–3050.
- Tendeng, C. & Bertin, P. N. (2003).** H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol* **11**, 511–518.
- Tendeng, C., Krin, E., Soutourina, O. A., Marin, A., Danchin, A. & Bertin, P. N. (2003b).** A Novel H-NS-like protein from an antarctic psychrophilic bacterium reveals a crucial role for the N-terminal domain in thermal stability. *J Biol Chem* **278**, 18754–18760.
- Tett, A., Spiers, A. J., Crossman, L. C., Ager, D., Ciric, L., Dow, J. M., Fry, J. C., Harris, D., Lilley, A., & other authors. (2007).** Sequence-based analysis of pQBR103; a representative of a unique, transfer-proficient mega plasmid resident in the microbial community of sugar beet. *ISME J* **1**, 331–340.
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005).** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711–721.
- Thompson, A., Rolfe, M. D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J. C. D. & Tedin, K. (2006).** The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* **281**, 30112–30121.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M. & Euzéby, J. P. (2005).**

- Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 521–524.
- Tippner, D. & Wagner, R. (1995)**. Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites. *J Biol Chem* **270**, 22243–22247.
- Torreblanca, J., Marqués, S. & Casadesús, J. (1999)**. Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. *Genetics* **152**, 31–45.
- Trachman, J. D. & Maas, W. K. (1998)**. Temperature regulation of heat-labile enterotoxin (LT) synthesis in *Escherichia coli* is mediated by an interaction of H-NS protein with the LT A-subunit DNA. *J Bacteriol* **180**, 3715–3718.
- Troxell, B., Fink, R. C., Porwollik, S., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2011a)**. The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *BMC Microbiol* **11**, 236.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. & Hassan, H. M. (2011b)**. Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497–505.
- Tupper, A. E., Owen-Hughes, T. A., Ussery, D. W., Santos, D. S., Ferguson, D. J., Sidebotham, J. M., Hinton, J. C. & Higgins, C. F. (1994)**. The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *EMBO J* **13**, 258–268.
- Ueguchi, C., Kakeda, M. & Mizuno, T. (1993)**. Autoregulatory expression of the *Escherichia coli hns* gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol Gen Genet* **236**, 171–178.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L. (2001)**. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 15264–15269.
- Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1997)**. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**, 2007–2011.
- van Ulsen, P., Hillebrand, M., Zulianello, L., van de Putte, P. & Goosen, N. (1996)**. Integration host factor alleviates the H-NS-mediated repression of the early promoter of bacteriophage Mu. *Mol Microbiol* **21**, 567–578.
- Vecerek, B., Moll, I., Afonyushkin, T., Kaberdin, V. & Bläsi, U. (2003)**. Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **50**, 897–909.
- Vial, P. A., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J. B., Nataro, J. P., Maneval, D., Elsayed, A. & Levine, M. M. (1988)**. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* **158**, 70–79.
- Vila, J., Vargas, M., Casals, C., Urassa, H., Mshinda, H., Schelleberg, D. & Gascon, J. (1999)**. Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 3022–3024.
- Vila, J., Vargas, M., Ruiz, J., Espasa, M., Pujol, M., Corachán, M., Jiménez de Anta, M. T. & Gascon, J. (2001)**. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol* **50**, 996–1000.
- Villaseca, J. M., Navarro-Garcia, F., Mendoza-Hernández, G., Nataro, J. P., Cravioto, A. & Eslava, C. (2000)**. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun* **68**, 5920–5927.

- Vivero, A., Baños, R. & Mariscotti, J. (2008).** Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **190**, 1152-1156.
- Wagner, C., Polke, M., Gerlach, R. G., Linke, D., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H. & Hensel, M. (2011).** Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesin of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* **13**, 1286–1301.
- Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C. & Kenney, L. J. (2007).** The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**, 477–493.
- Welch, T. J., Farewell, A., Neidhardt, F. C. & Bartlett, D. H. (1993).** Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol* **175**, 7170–7177.
- Willetts, N. S., Clark, A. J. & Low, B. (1969).** Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **97**, 244–249.
- Williams, R. M. & Rimsky, S. (1997).** Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 175–185.
- Williams, R. M., Rimsky, S. & Buc, H. (1996).** Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. *J Bacteriol* **178**, 4335–4343.
- Williamson, H. S. & Free, A. (2005).** A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic *Escherichia coli* acts as an H-NS antagonist. *Mol Microbiol* **55**, 808–827.
- Wilson, R. L., Libby, S. J., Freet, A. M., Boddicker, J. D., Fahlen, T. F. & Jones, B. D. (2001).** Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. *Mol Microbiol* **39**, 79–88.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., & other authors. (2010).** Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–429.
- Wooldridge, K. G. & Williams, P. H. (1993).** Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 325–348.
- Worley, M. J., Ching, K. H. & Heffron, F. (2000).** *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**, 749–761.
- Yamada, H., Muramatsu, S. & Mizuno, T. (1990).** An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J Biochem* **108**, 420–425.
- Yamamoto, T., Echeverria, P. & Yokota, T. (1992).** Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **165**, 744–749.
- Yang, J., Baldi, D. L., Tauschek, M., Strugnell, R. A. & Robins-Browne, R. M. (2007).** Transcriptional regulation of the *yghJ-pppA-yghG-gspCDEFGHIJKLM* cluster, encoding the type II secretion pathway in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 142–150.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119.
- Yee, A., Chang, X., Pineda-Lucena, A., Wu, B., Semesi, A., Le, B., Ramelot, T., Lee, G. M., Bhattacharyya, S., & other authors. (2002).** An NMR approach to structural proteomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1825–1830.
- Yeh, K.-S., Tinker, J. K. & Clegg, S. (2002).** FimZ binds the *Salmonella typhimurium* *fimA* promoter region and may regulate its own expression with FimY. *Microbiol*

- Immunol* **46**, 1–10.
- Zhou, D. & Galán, J. (2001).** *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect* **3**, 1293–1298.
- Zhou, D., Mooseker, M. S. & Galán, J. E. (1999).** Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**, 2092–2095.

ANEXO I

Nombre	Secuencia (5' - 3')	orientación (+/-)
HILAP1	ATGCCACATTTTAATCCTGCGGGGGTATCGCTGTTTCCAAAAAATTCGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	+
HILAP2	TTACCGTAATTTAATCAACCGGGGATCCTGTTTCCATCTTTCATATGAATATCCTCCTTAGT	-
HILAPIUP	ATTATCATGCCACATTTTAATCC	+
HILAP2DOWN	TTACCGTAATTTAATCAAGCG	-
CATC1	CCTTGTCGCCTTGCGTATAA	-
CATC2	CCTACCTGTGACGGAAGATC	+
LACZR	GATGACCTGCAAGGCGATTA	-
HNSP1	ATGAGCGAAGCACTTAAAATTCTGAACAACATCCGTA CTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
HNSP2	TTATTGCTTGATCAGGAAATCGTCGAGGGATTTACCTTGCTCCATATGAATATCCTCCTTAG T	-
HNSP1UP	CCACCCCAATATAAGTTTGAG	+
HNSP2DOWN	CTGGCGGGATTTTAAGCAAG	
IHFAO42P1	ATGGCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTTGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
IHFAO42P2	TTACTCGTCTTTGGGCGAAGCGTTTTTCGACCCGGCTTTTTAACATATGAATATCCTCCTTAGT	-
IHFAO42P1UP	CCAGGCATCATTGAGGGATTG	+
IHFAO42P2DOWN	CAGAGCGGCCTTTTTAGTTAG	-
IHFBO42P1	ATGACCAAGTCAGAATTGATAGAAAGACTTGCCACCCAGCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	+

	C	
IHFBO42P2	TTAACCGTAAATATTGGCGCGATCGCGCAGTTCTTTACCTGGCATATGAATATCCTCCTTAG T	-
IHFBO42P1UP	GCCTTTAAGGAACCGGAGG	+
IHFBO42P2DOWN	GGTGCTTTTCTCGCGTTCAAG	-
IHFAP1	ATGGCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTTGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
IHFAP2	TTACTCTTCTTTGGGCGAAGCGTTTTTCGACCCGGCTCTTTAACATATGAATATCCTCCTTAGT	-
IHFAP1UP	GTGTAGAGGCATTTAAAAGAGCG	+
IHFAP2DOWN	CAAAAGGTCAGCATGTTATCC	-
IHFBP1	ATGACCAAGTCAGAATTGATTGAAAGACTTGCAACCCAGCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT C	+
IHFBP2	TTAACCGTAAATATTGGCGCGATCGCGCAGTTCTTTACCCGGCATATGAATATCCTCCTTAG T	-
IHFBP1UP	GCAGCCAATTTGCCTTTAAGG	+
IHFBP2DOWN	CCGTCGTTATCTTCATAGAC	-
HILCP1	ATGGTATTGCCTTCAATGAATAAATCAGTTGAGGCCATTAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
HILCP2	TCAATGGTTCATTGTACGCATAAAGCTAAGCGGTGTAATCTTCATATGAATATCCTCCTTAG T	-
HILCP1UP	GAGTTCCTTATAGCACACAGG	+
HILCP2DOWN	GTAACGCAAACAGATAGTAACG	-

HILDP1	ATGGAAAATGTAACCTTTGTAAGTAATAGTCATCAGCGTCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
HILDP2	TTAATGGTTCGCCATTTTTATGAATGTTCGATGGCGTAGTTTTTCATATGAATATCCTCCTTAGT	-
HILDP1UP	GTAGGATACCAGTAAGGAAC	+
HILDP2DOWN	GCGTGTTAATGCGCAGTCTG	-
SIPA3XP1	TCGGGTTATTACTACCGTTGATGGCTTGCACATGCAGCGTGACTACAAAGACCATGACGG	+
SIPA3XP2	AATATCCATATTCATCGCATCTTTCCCGGTTAATTAACGCCATATGAATATCCTCCTTAG	-
SIPA3XP1UP	CGTTGAAAGCGCAATGTAG	+
SIPA3XP2DOWN	CATATATTGCAGCCATACTC	-
HHAO42P1	ATGTCCGAAAAACCTTTAACGAAAACCGATTATTTAATGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
HHAO42P2	TTAGCGAATAAATTTCCATACTGAGGAAGGGATCTTGTCGTACATATGAATATCCTCCTTAG T	-
HHAO42P1UP	GTTAGAATTATTACAACCATGGG	+
HHAO42P2DOWN	GCCGGTTATAGCTCTGAAAG	-
HNSO42P1	ATGAGCGAAGCACTTAAAATTCTGAACAACATCCGTA CTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	+
HNSO42P2	TTATTGCTTGATCAGGAAATCGTCGAGGGATTTACCTTGCCCATATGAATATCCTCCTTAGT	-
HNSO42P1UP	CCACCCCAATATAAGTTTGAG	+
HNSO42P2DOWN	GGGATTTTAAGCAAGTGCAATC	-
AAFA3XP1	AATATATGAAGTAGTATTAATGCTGAGCTTGTGACAAATGACTACAAAGACCATGACGG	+
AAFA3XP2	CCAAAAGTTATTATATTGTCACAAGCTCAGCATTTAATTTTCATATGAATATCCTCCTTAG	-
AAFA3XP1UP	GCCTCTCCTAGGTTTTCTTAC	+

AAFA3XP2DOWN	CACTATCAATAAGTTGGAGTC	-
AGGR3XP1	CATAACACCAAAAACAATTCTTGACTTATTTTAAAAGCCAAGACTACAAAGACCATGACGG	+
AGGR3XP2	TTTATAGCAATCTCAAATAATGATATGAAACATGTTTTTATTGGCATATGAATATCCTCCTT AG	-
AGGR3XP1UP	GCTTGATAACTCATATCAGATATC	+
AGGR3XP2DOWN	CTCCTGTTCAGCTACTGACG	-
EILANEWP1	ATGCAACTGCAACATGGAAAAATACTACACAACAATATATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTT C	+
EILANEWP2	TTACGCAGAAGTACGCATCACACCAATAGTATTAATTCGTTTCATATGAATATCCTCCTTAG T	-
EILANEWP1UP	CCTCATCACAATCTTACAAAATG	+
EILANEWP2DOWN	GATGACGGCATTGACCATAG	-
YGEHP1	ATGGACTTAGAAAATAAATTCTCATATCATTTTCTTGAGGGATTAACGCTCGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	+
YGEHP2	TTATCGCATACAAATTCTTGTCAGTTGCTTTAGTTTCAAATGTTGTCAATCATATGAATATC CTCCTTAGT	-
YGEHP1UP	CTCATATCATTTTCTTGAGGG	+
YGEHP2DOWN	CTTGTCAGTTGCTTTAGTTTC	-
YGEHBAMHI5'	CGGGATCCGCATTACAATCATTTGGTTAAAATTGC	+
YGEHBAMHI33	CGCGGATCCATTTTCTAAGTCCAT	-

EILAECORI5'	CGGAATTCTTAAGTAACACCCACAATTATC	+
EILABAMHI3'	CGGGATCCGTATTTTTTCCATGTTGCAGTTGCAT	-
EILAKPNI5'	GGGGTACCGAATAGAGAAAACGGAAGGAGCGTTCTATG	+
YGEHKPNI5'	GGGGTACCCAATTTTTTCATAGAGGTAACTAATG	+
EILAHINDIII3'	CCCAAGCTTTTACGCAGAAGTACGCATCACACC	-
YGEHHINDIII3'	CCCAAGCTTTTATCGCATACAAATTCTTGTCAG	-
M13FW	GTTTTCCAGTCACGAC	+
M13RV	CAGGAAACAGCTATGAC	-
PBADFW	GCTATGCCATAGCATTTTTATCC	+
PBADRV	GATTTAATCTGTATCAGGCTG	-
HHAMFW	CAATCATAGGTAGAATTTATG	+
HHAMRV	GCCAGAACGAGGAGGCAG	-
HNST5	GTCTATCCAAGGAGCAAAAAAATG	+
HNST3	TCAGTCAATGAGATCTTCTGG	+
AECORI5	GGAATTCATCATTGAGGGATTGAACCTATG	+
AKPNI3	GGGGTACCTTACTCGTCTTTGGGCGAAGC	-
BXBAI5	GCTCTAGACTTTAAGGAACCGGAGGAATCATG	+
BSPHI3	ACATGCATGCTTAACCGTAAATATTGGCGCG	-
HILABADFW	CGGAATTCGTAAGAGAATACTATTATCATGCCA	+
HILABADRV	GCTCTAGATTACCGTAATTTAATCAAGCGGGG	-

KT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	-
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	+
HILAECORI5	ACAGCGTAAGAATTCGTCCA	+
HILABAMHI23	GGAACAGGATCCAAATGTGGCAT	-
HILAPEX3.2	GGTAATAATATTGTTATAACTAACTGTG	-
YGEHRT5	CCTCATCGCCAGTAATCATCTTCC	+
YGEHRT3	CAAAGACATATGGCATTCCGC	-
EILART5	GGTTTACTGGGTTTAATCAGTGG	+
EILART3	GCAAAAGATATCGCGTTATCGAG	-
EIVFRT5	GACCGAAGCCAAATTGAGGTAAGT	+
EIVFRT3	GAGTGAAGTATGTATGAGCGATTGC	-
AIRRT5	CGGCGTGAAGAAAGTATGGTGGTC	+
AIRRT3	CCTGGTCTGTCTCAATCGTGGAGTC	-
HLYSAL/ECO-5'	CAGACCACACCTGGAAAAAC	+
HLYSAL/HIND3'	CGGCTTCACTGCGAAATTCA	-
16S1	GCTGCATGGCTGTCGTCAG	+
16S3	CGCAGGTTCCCCTACGGTT	-

ANEXO II

Integration host factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium master regulator of SPI1, *hilA*

Mário H. Queiroz,¹ Cristina Madrid,¹ Sònia Paytubi,¹ Carlos Balsalobre¹ and Antonio Juárez^{1,2}

Correspondence
Antonio Juárez
ajuarez@ub.edu

¹Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

²Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixach, 15-21, 08028 Barcelona, Spain

Coordination of the expression of *Salmonella enterica* invasion genes on *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) depends on a complex circuit involving several regulators that converge on expression of the *hilA* gene, which encodes a transcriptional activator (HilA) that modulates expression of the SPI1 virulence genes. Two of the global regulators that influence *hilA* expression are the nucleoid-associated proteins Hha and H-NS. They interact and form a complex that modulates gene expression. A chromosomal transcriptional fusion was constructed to assess the effects of these modulators on *hilA* transcription under several environmental conditions as well as at different stages of growth. The results obtained showed that these proteins play a role in silencing *hilA* expression at both low temperature and low osmolarity, irrespective of the growth phase. H-NS accounts for the main repressor activity. At high temperature and osmolarity, H-NS-mediated silencing completely ceases when cells enter the stationary phase, and *hilA* expression is induced. Mutants lacking IHF did not induce *hilA* in cells entering the stationary phase, and this lack of induction was dependent on the presence of H-NS. Band-shift assays and *in vitro* transcription data showed that for *hilA* induction under certain growth conditions, IHF is required to alleviate H-NS-mediated silencing.

Received 18 February 2011
Revised 27 May 2011
Accepted 10 June 2011

INTRODUCTION

Salmonella enterica serovars are able to colonize and cause disease in a wide range of hosts. These bacteria are facultative intracellular pathogens that are typically ingested from contaminated food or water. Inside the host, they can invade and survive in epithelial cells and macrophages. Therefore, invasion of the host intestinal cells is critical for the initiation of salmonellosis. Several genetic elements responsible for the invasive phenotype of *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) map to a 40 kb region of the chromosome at centrisome 63, termed *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1). Pathogenicity islands are genetic elements of the chromosomes of several bacterial pathogens (Schmidt & Hensel, 2004) and accommodate clusters of genes that contribute to a particular virulence phenotype. *Salmonella* SPI1 encodes various components of a type III secretion system (T3SS), including its regulators

and its specific effectors (Collazo & Galán, 1997; Marcus *et al.*, 2000).

The ability of a bacterial pathogen to cause infection and disease requires not only the display of several virulence determinants, but a precise control of their expression, such that each is expressed at the appropriate time and place in the host. A good example of this is SPI1 expression. Several environmental factors and regulators have been shown to affect SPI1 expression (Altier, 2005). SPI1 environmental regulation converges in the modulation of the *hilA* gene (Ellermeier & Slauch, 2007). *hilA* is located on SPI1 and encodes the HilA protein, a member of the OmpR/ToxR family of regulators (Bajaj *et al.*, 1995, 1996; Lee *et al.*, 1992). Induction of HilA switches on the expression of SPI1 genes, including the T3SS. Different studies have shown that low oxygen, high osmolarity, the exponential phase of growth and slightly alkaline pH induce *hilA* expression and consequently the invasion genes (Bajaj *et al.*, 1996; Jones & Falkow, 1994; Chubiz *et al.*, 2010). Other recent studies have shown that, when *Salmonella* cells are grown in aerated Luria–Bertani (LB) medium at 37 °C, *hilA* induction occurs at the onset of the

Abbreviations: EMSA, electrophoretic mobility shift assay; IHF, integration host factor; SPI1, *Salmonella* pathogenicity island 1; T3SS, type III secretion system; wt, wild-type.

A supplementary table, showing the oligonucleotides used in this paper, is available with the online version of this paper.

stationary phase (Song *et al.*, 2004; Mangan *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2008). These culture conditions have been used to further analyse the effects of modulators such as ppGpp (Song *et al.*, 2004) and integration host factor (IHF) (Mangan *et al.*, 2006), and the regulatory cross-talk between SPI1 and SPI2 (Bustamante *et al.*, 2008). Most likely, low oxygen/exponential growth phase and aeration/early stationary phase mimic different environmental inputs that *Salmonella* cells detect when growing in natural environments, and lead to *hilA* induction.

HilA expression is subject to both positive and negative modulation. Three AraC-like transcriptional activators have been reported to bind to the *hilA* promoter: HilC, HilD and RtsA (Ellermeier & Slauch, 2004; Ellermeier *et al.*, 2005). *hilC* and *hilD* are also located on SPI1, and *rtsA* maps outside it. Each of these activators can independently bind to the *hilA* promoter and activate *hilA* expression. HilD is dominant, and there is no *hilA* expression in its absence. In response to different stimuli, HilD activates HilC and RtsA transcription. Enhanced HilC/RtsA levels, in turn, activate *hilA* transcription (Ellermeier & Slauch, 2007). Interestingly, *hilD* mRNA levels have been found to be dependent upon DNA adenine methylation (Dam) activity, thus suggesting posttranscriptional control of HilD expression (López-Garrido & Casadesús, 2010). Several other global modulators also activate *hilA* expression, among them the two-component systems EnvZ/OmpR and BarA/SirA. Their effect seems to be indirect, as they sense osmolarity and bile/short-chain fatty acids, respectively (Altier, 2005; Ellermeier *et al.*, 2005; Lucas & Lee, 2001). Other global regulators that positively modulate *hilA* expression are Fur (Ellermeier & Slauch, 2008) and the nucleoid-associated proteins Fis, HU (Schechter *et al.*, 2003) and the bacterial IHF (Mangan *et al.*, 2006). IHF binds to many target DNA sequences and plays a role as a transcription factor (Browning *et al.*, 2010). IHF bends target DNA sequences, and usually modulates gene expression together with other nucleoid-associated proteins and/or other transcriptional factors.

hilA expression is also negatively modulated by several factors. A crucial repressor of SPI1 genes, including *hilA*, is HilE. It is likely that the effect of HilE is exerted by direct interaction with HilD, thus blocking its activity (Baxter *et al.*, 2003). In turn, HilE expression is sensitive to several inputs, including the two-component systems PhoP/PhoQ and PhoR/PhoB, which either directly or indirectly activate HilE expression, thus leading to SPI1 repression. Negative modulation of *hilA* is also accomplished by global modulators such as Hha (Fahlen *et al.*, 2001) and H-NS (Olekhovich & Kadner, 2006; Schechter *et al.*, 2003). Both belong to the superfamily of the nucleoid-associated proteins (Dorman, 2004; Madrid *et al.*, 2007) and have been shown to interact to modulate gene expression (Ellison & Miller, 2006; Madrid *et al.*, 2002; Nieto *et al.*, 1991, 2002). The nucleoid-associated protein H-NS is a well-characterized example of a modulator that influences gene expression in response to environmental stimuli such

as osmolarity, pH and temperature (Hulton *et al.*, 1990; Hommais *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2005). Hha mimics the H-NS oligomerization domain (Madrid *et al.*, 2007), copurifies with H-NS (Nieto *et al.*, 2002) and targets a subset of the H-NS-modulated genes, several of which have been acquired by horizontal gene transfer, such as several virulence determinants (Vivero *et al.*, 2008; Baños *et al.*, 2009).

The SPI1 can be considered as a paradigm of a bacterial virulence determinant that responds to a large number of environmental and physiological stimuli through a complex array of interacting regulatory networks. Despite the fact that a large number of stimuli and modulators have been hitherto identified as influencing SPI1 expression, in only a few instances has a potential environmental stimulus been associated with a specific regulatory system. Relevant questions that remain to be answered relate to the precise identification of the stimuli to which the different regulators respond and the integration of the different regulatory circuits that govern *hilA* expression. In the present study we extend earlier work on the role of Hha and H-NS in the silencing of *hilA* expression (Olekhovich & Kadner, 2006) and link it to environmental factors and the physiological state of the bacterial cells. Under non-permissive conditions (i.e. low temperature, low osmolarity and exponential growth phase), H-NS plays a crucial role in silencing *hilA* expression and Hha potentiates H-NS-mediated silencing. Moreover, we provide evidence to indicate that H-NS silencing of *hilA* is antagonized by IHF.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

S. Typhimurium SV5015 is a His⁺ derivative of strain SL1344 (Baños *et al.*, 2009). To construct the transcriptional *lac* fusion in *hilA*, the gene was first disrupted in the SV5015 strain using the procedure of Datsenko & Wanner (2000). The oligonucleotides used for this construction were HILAP1/HILAP2 (Supplementary Table S1), which amplified the antibiotic resistance of plasmid pKD3 with extensions corresponding to sequences of *hilA*. After verification of the predicted deletion using the combination of oligonucleotides HILAP1UP/KT and K2/HILAP2DOWN, antibiotic-resistance determinants were eliminated using an FLP/FRT-mediated site-specific recombination method, as described by Cherepanov & Wackernagel (1995). The FRT-generated site was used to integrate plasmid pKG136 (Ellermeier *et al.*, 2002), thereby generating the transcriptional *hilA::lacZY* fusion strain SV5015UB2. The SV5015UB2 strain was used as a donor strain to transfer the *hilA::lacZY* fusion to strains SV5015H, SV5015AV1 and SV5015HAV1 using phage P22 HT (Sternberg & Maurer, 1991), generating strains SV5015UB2H, SV5015UB2AV1 and SV5015UB2HAV1, respectively.

Chromosomal deletions of the genes *hilC*, *hilD*, *ihfA* and *ihfB* were done in strain SV5015UB2 by the λ Red recombinant method, as described by Datsenko & Wanner (2000). The antibiotic-resistance determinant of plasmid pKD3 was amplified using primers HILCP1/HILCP2, HILDp1/HILDp2, IHFAP1/IHFAP2 and IHFBP1/IHFBP2 (Supplementary Table S1). The resulting PCR products were purified and electroporated into strain SV5015UB2. The mutants were

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Abbreviations: Cb, carbenicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tc, tetracycline.

Strain or plasmid	Description	Source or reference
S. Typhimurium strains		
SV5015	SL1344 <i>his</i> ⁺	J. Casadesús*
SV5015H	SV5015 Δ <i>hha</i> ::Cm	Vivero <i>et al.</i> (2008)
SV5015AV1	SV5015 Δ <i>hns</i>	Baños <i>et al.</i> (2009)
SV5015HAV1	SV5015 Δ <i>hha</i> ::Cm Δ <i>hns</i>	R. C. Baños†
SV5015UB2	SV5015 Φ <i>hilA-lacZY</i>	Baños <i>et al.</i> (2009)
SV5015UB2H	SV5015UB2 Δ <i>hha</i> ::Cm	This work
SV5015UB2AV1	SV5015UB2 Δ <i>hns</i>	This work
SV5015UB2HAV1	SV5015UB2 Δ <i>hha</i> ::Cm Δ <i>hns</i>	This work
SV5015UB2IHFA	SV5015UB2 Δ <i>ihfA</i> ::Cm	This work
SV5015UB2IHFB	SV5015UB2 Δ <i>ihfB</i> ::Cm	This work
SV5015UB2D	SV5015UB2 Δ <i>hilD</i> ::Cm	This work
SV5015UB2CD	SV5015UB2 Δ <i>hilC</i> Δ <i>hilD</i> ::Cm	This work
LB5000	rLT ⁻ rSA ⁻ rSB ⁻	Bullas & Ryu (1983)
Plasmids		
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>ahp</i> FRT PS1 PS2 oriR6K Km ^r Cb ^r	Datsenko & Wanner (2000)
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 oriR6K Cm ^r Cb ^r	Datsenko & Wanner (2000)
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 oriTS Cb ^r	Datsenko & Wanner (2000)
pKG136	<i>ahp</i> FRT <i>lacZY</i> ⁺ <i>t</i> _{his} oriR6K	Ellermeier <i>et al.</i> (2002)
pCP20	<i>bla cat cI857</i> I _{P_Rflp pSC101 oriTS Cb^r}	Cherepanov & Wackernagel (1995)
pGEM-T Easy	rep _{pMB1} P _{T7} P _{SP6} Cb ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pBAD18	rep _{pMB1} P _{araBAD} Cb ^r	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBADHNSt	pBAD18 + <i>hnsT</i> _{EPEC}	This work
pBR322	ori _{pMB1} Cb ^r Tc ^r	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pUBM22	pBR322 + <i>hha</i> Cb ^r	Nieto <i>et al.</i> (1991)
pTE103	<i>In vitro</i> transcription vector Cb ^r	Elliott & Geiduschek (1984)
pTEhilA	<i>hilA</i> promoter region (-505 to +372) on pTE103	This work

*Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

†Institut de Bioenginyeria de Catalunya, Barcelona, Spain.

confirmed by PCR using the primers CAT-C1 and CAT-C2 (chloramphenicol resistance; Cm^r) in combination with specific primers located in the remaining gene sequence nearby (Supplementary Table S1, P1UP/P2DOWN series primers).

Plasmid pBADHNSt was constructed by cloning the *hnsT*_{EPEC} gene from plasmid pHSGHNSTE into the pBAD18 vector. The *hnsT*_{EPEC} gene was amplified by PCR using oligonucleotides HNST5 and HNST3 (Supplementary Table S1), using plasmid pHSGHNSTE as template. The resulting PCR product was inserted into the pGEM-T Easy vector in order to gain an *EcoRI* restriction site. The resulting plasmid was sequenced and digested with *EcoRI*. The liberated *EcoRI* fragment was excised from the agarose and purified using a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). The resulting *EcoRI* fragment was inserted into the pBAD18 vector previously digested with *EcoRI*, giving plasmid pBADHNSt. DNA sequencing was performed to confirm that the insertion was correctly in-frame with the pBAD18 vector.

Cultures were grown either in LB medium (10 g NaCl l⁻¹) at 25 or 37 °C, or in salt-free LB medium at 37 °C. The cultures were diluted 1:100 from an overnight culture in 20 ml fresh medium in 100 ml flasks, and incubated with vigorous shaking at 200 r.p.m. (Innova 3100 water bath shaker, New Brunswick Scientific) until the desired OD₆₀₀ was achieved (0.4 and 2.0 for exponential and early stationary phase cultures, respectively). For HNST_{EPEC} induction from the pBADHNSt plasmid, the cultures were diluted 1:200 from an overnight culture in

20 ml fresh LB containing L-arabinose (Sigma) at a final concentration of 0.02%. The cultures were incubated at 37 °C (200 r.p.m.) in 100 ml flasks and cells were collected at the early stationary phase (OD₆₀₀ 2.0). Medium SOC (Miller, 1992) was used for the recovery of transformants. Antibiotics, where appropriate, were added to the following final concentrations (μg ml⁻¹): carbenicillin, 50; kanamycin, 50; chloramphenicol, 25.

Genetic and molecular procedures. Basic molecular genetic manipulations were performed as described by Sambrook & Russell (2001). Enzymes were used according to the manufacturer's recommendations. Introduction of plasmids into *Escherichia coli* and *S. Typhimurium* strains was performed by electroporation of 10% glycerol-washed cells using an Eppendorf gene pulser (Electroporator 2510). Plasmids isolated in *E. coli* were first passaged through restriction-deficient *S. Typhimurium* strain LB5000 before transformation of competent cells.

β-Galactosidase assays. β-Galactosidase activity measurements were performed as described by Miller (1992).

Electrophoresis and Western blotting analysis of proteins. Protein samples were analysed by SDS-PAGE at 15%. From the gels, proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Western blot analysis was performed with polyclonal antibodies raised against

E. coli Hha protein (Balsobre *et al.*, 1996) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10 000; Sigma). Detection was performed by enhanced chemiluminescence using Quantity One software (Bio-Rad).

Identification of the IHF-binding site on the *hilA* promoter. The putative IHF-binding site was determined using Virtual Footprint software (Münch *et al.*, 2005) (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>). The *hilA* promoter spanning from positions -505 to $+372$ (relative to the transcriptional start site) was subjected to analysis using the position weight matrix IHF from *E. coli* K-12. The best match is shown in Fig. 4(a), where the *hilA* promoter is presented from position -308 to -76 in order to minimize the figure width.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). For competitive EMSA, an 877 nt fragment corresponding to the *hilA* promoter (nucleotides -505 to $+372$) was generated by PCR using primers HILAECORI5/HILABAMHI23 (Supplementary Table S1). Ten picomoles of the PCR product was radiolabelled with [γ - 32 P]ATP (PerkinElmer) using T4 Polynucleotide Kinase (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. For each reaction, 35 fmol DNA template was mixed with H-NS-His or IHF proteins in binding buffer (250 mM HEPES, pH 7.4, 350 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 500 μ g BSA ml $^{-1}$, 25%, v/v, glycerol) and incubated at 37 °C for 15 min. Increasing concentrations of H-NS-His or IHF protein were added when indicated, and the reaction was continued at 37 °C for 15 min. The samples (20 μ l) were separated on a 5% polyacrylamide/0.5 \times TBE gel. The bands were visualized using Quantity One software (Bio-Rad). Purified H-NS-His protein was obtained as described by Nieto *et al.* (1991). IHF protein was kindly supplied by Professor Fernando de la Cruz, Universidad de Cantabria and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Santander, Spain.

Transcription assays and primer extension. The *hilA* promoter corresponding to nucleotides -505 to $+372$ was PCR-amplified using the oligonucleotides HILAECORI5 and HILABAMHI23 (Supplementary Table S1). The resulting PCR product together with plasmid pTE103 was digested with *Eco*RI and *Bam*HI following the manufacturer's instructions (Fermentas). The resulting plasmid pTEhilA was used as template in the *in vitro* transcription assays.

To determine whether H-NS and/or IHF have an effect on the initiation of transcription, single-round transcription was carried out as follows. *In vitro* transcription reactions were performed in a 25 μ l mixture containing 150 ng of the supercoiled plasmid pTEhilA, 200 μ M each ribonucleotide triphosphate (rNTP), 5 U RNA polymerase (RNAP) (USB), and H-NS and IHF in the amounts indicated in Fig. 6. When indicated, IHF was incubated with the DNA in transcription buffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 25 mM KCl, 5 mM MgCl $_2$, 2.5 mM DTT, 25 μ g BSA ml $^{-1}$) for 10 min at 37 °C prior to the transcription assay. Then, H-NS was added and the reaction was incubated for 10 min at 37 °C. After this time, 5 U *E. coli* RNAP was added to the mix and recruitment to the promoter was allowed to proceed for 10 min at 37 °C. At this point, the rNTPs rATP, rCTP and rUTP were added to the mixture to stall the RNAP at position 17 in the absence of rGTP, and after 2 min 100 ng heparin μ l $^{-1}$ (final concentration) and GTP were added. The reaction was continued for 20 min at 37 °C and then stopped by inactivation of the RNAP at 75 °C for 10 min.

The *in vitro*-synthesized RNA was used as template for primer extension reactions. Transcription products were detected by primer extension using 300 fmol [γ - 32 P]ATP-labelled HILAPEX3.2 primer (Supplementary Table S1). RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas) was used according to the manufacturer's instructions. After incubation for 1 h at 42 °C, 10 μ l loading buffer (95% formamide, and 0.025% each of bromophenol blue and xylene cyanol) was added, the sample was boiled for 2 min at 95 °C and

chilled on ice, and 20 μ l was loaded onto a 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The bands were visualized using Quantity One software (Bio-Rad).

RESULTS

Effect of temperature, osmolarity and growth phase on *hilA* expression in strain SV5015

Some reports have established that low-osmolarity and low-temperature conditions result in reduced *hilA* expression (Ono *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2003), and others have shown that *hilA* expression is growth phase-dependent, being *hilA*-induced at the onset of the stationary phase when cells are grown in aerated LB medium (Song *et al.*, 2004).

We first assessed the possibility that the effect of growth phase on *hilA* expression is temperature- and/or osmolarity-dependent. To do this, *hilA* transcription was evaluated in SV5015UB2 wild-type (wt) cells growing aerobically under different temperature and osmolarity conditions (25 and 37 °C, and low and high osmolarity, i.e. salt-free and conventional LB medium, respectively). Both exponential and early stationary phase samples were collected for each growth condition. The results obtained (Fig. 1) clearly showed that, as expected, *hilA* expression was repressed both at low osmolarity and at low temperature. Under these conditions, no growth phase effect was apparent. In contrast, growth at high osmolarity and temperature (LB medium, 37 °C) resulted in a growth phase-dependent induction of *hilA*. Altogether, these results show that, when growing in an aerated rich medium such as LB, high levels of *hilA* expression require a combined set of external stimuli

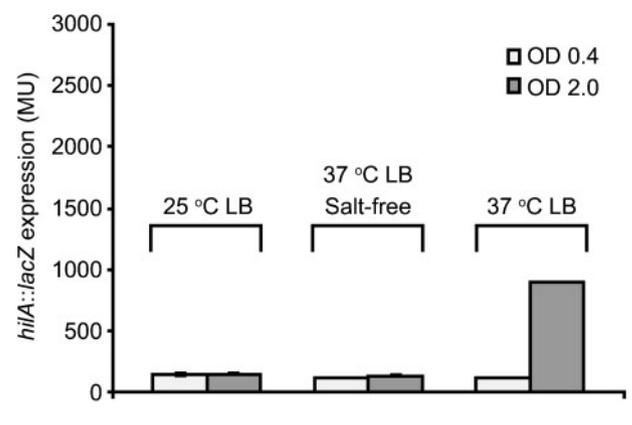


Fig. 1. Effect of temperature and osmolarity on *hilA* transcription. To test the effect of temperature, β -galactosidase activity (in Miller units; MU) was monitored in strain SV5015UB2 grown in LB medium at 25 and 37 °C. To test the effect of osmolarity, salt-free LB medium was used. Samples were collected either at the exponential phase of growth (OD₆₀₀ 0.4) or at the early stationary phase (OD₆₀₀ 2.0). The data shown are the means and SDs of three independent experiments.

(high temperature and osmolarity) and a specific physiological state of the cell (stasis).

Temperature, osmolarity and growth phase-dependent silencing of *hilA* by H-NS and Hha

In the *Enterobacteriaceae*, H-NS and Hha are involved in thermo- and osmoregulation of several genes. We next assessed the role of the two proteins on low temperature- and low osmolarity-dependent *hilA* silencing at the exponential as well as at the early stationary growth phase. Strains SV5015UB2, SV5015UB2 Δhha , SV5015UB2 Δhns and SV5015UB2 $\Delta hha \Delta hns$ were grown either in salt-free LB medium at 37 °C or in LB medium at 25 °C. β -Galactosidase expression was monitored in cells collected at the exponential phase of growth, as well as at the early stationary phase (Fig. 2). With respect to low-temperature growth conditions (Fig. 2a), the effect of *hns*, *hha* and *hns hha* alleles on *hilA* expression indicated that H-NS plays the predominant role in growth phase-independent *hilA* thermosilencing. The effect of the *hha* allele alone at 25 °C was almost undetectable. With respect to low-osmolarity conditions, *hilA* expression was derepressed in both *hha* and *hns* genetic backgrounds (Fig. 2b). The *hns* mutant showed a significantly higher derepression than the *hha* mutant. The double *hns hha* mutant showed the highest β -galactosidase activities at both low osmolarity and low temperature, indicating that Hha enhances H-NS-mediated *hilA* silencing. *hilA* transcription in the double *hha hns* mutant either at low osmolarity or at low temperature was still higher than in the wt strain under growth conditions that led to stationary phase *hilA* induction (growth in LB medium at 37 °C, stationary phase) (Fig. 1). This highlights the role of both proteins in *hilA* silencing at low osmolarity and low temperature in a growth phase-independent manner.

We next tested the role of H-NS and Hha proteins on *hilA* expression in cells growing in LB medium at high temperature (37 °C). Again, samples from strain SV5015UB2 and the corresponding *hns*, *hha* and *hha hns* derivatives were collected at both the exponential and early stationary growth phases, and *hilA* transcriptional expression was determined by monitoring β -galactosidase activity (Fig. 2c). In exponential phase cells, the results obtained provided evidence that H-NS and Hha repress *hilA* expression. Moreover, both proteins had an additive effect on *hilA* expression. In early stationary phase cells, H-NS did not further silence *hilA* expression. A modest effect repressing *hilA* was seen for Hha (1.5-fold induction in *hha* mutants when compared with wt cells). Earlier results have also indicated this differential role of Hha and H-NS on *hilA* expression (Olekhovich & Kadner, 2006). Considering that in *hns* mutants Hha levels are increased (Hommais *et al.*, 2001), one might speculate that the excess of Hha in an *hns* mutant may moderately repress *hilA* transcription. To support this hypothesis, *hilA* transcription was monitored in strain SV5015UB2, which ectopically expresses Hha from plasmid pUBM22 (Nieto *et al.*,

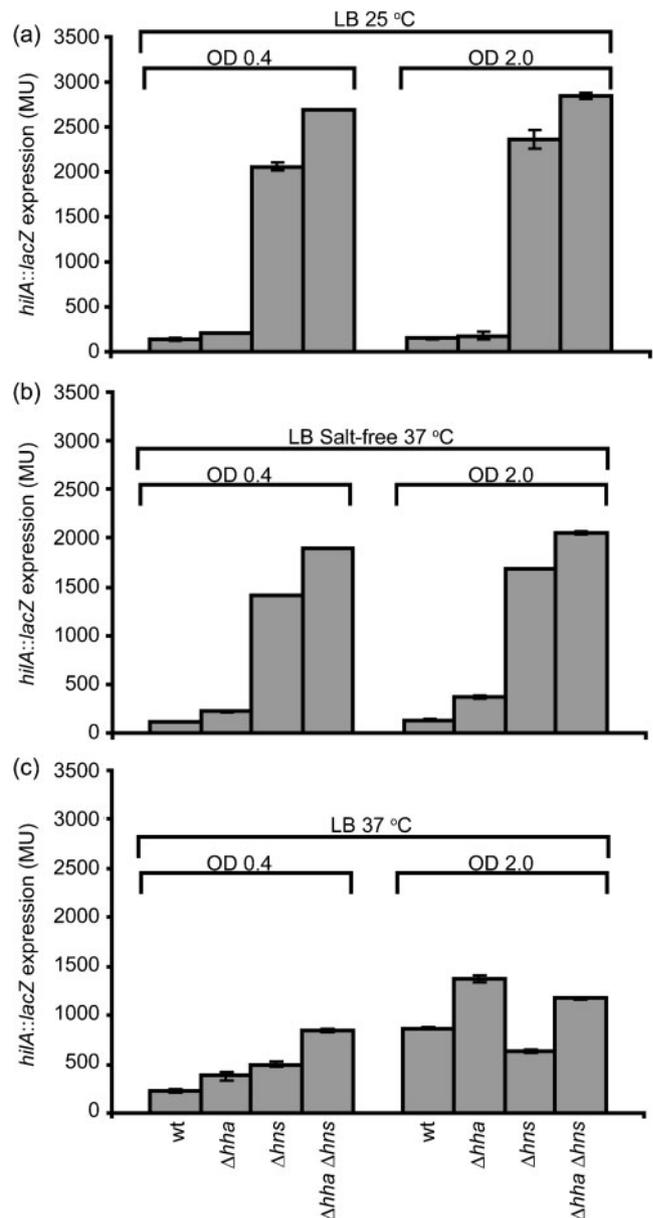


Fig. 2. Effect of *hns* and *hha* mutations on temperature- and osmolarity-dependent *hilA* expression. (a) β -Galactosidase expression (in Miller units; MU) from cultures grown at 25 °C in LB medium and (b) from cultures grown at 37 °C in LB salt-free medium. The growth phase of the cultures is indicated. (c) Effect of *hns* and *hha* alleles on growth phase-dependent *hilA* induction. Cells from LB cultures grown at 37 °C were harvested at the exponential and early stationary phases of growth, and β -galactosidase activity was monitored. The data shown are the means and SDs of three independent experiments.

1991). Overexpression of Hha resulted in reduced *hilA* transcription (Fig. 3).

It is well established that both high and low temperature influence H-NS silencing (Falconi *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2005). In this work we were able to

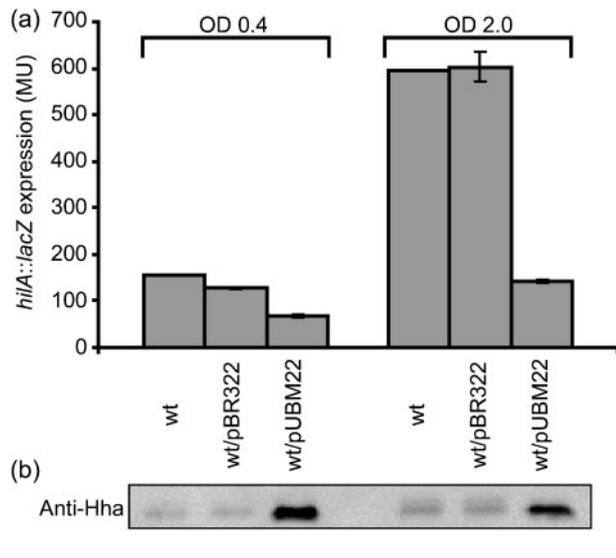


Fig. 3. Overexpression of Hha represses *hilA* transcription in cells growing in LB at 37 °C. (a) Expression of β -galactosidase (in Miller units; MU) from the chromosomal *hilA-lacZYA* transcriptional fusion in cells harbouring no plasmid, plasmid pBR322 or plasmid pUBM22. (b) Immunodetection of Hha protein in the corresponding cell extracts.

observe that both temperature and osmolarity modified the ability of H-NS to silence *hilA*. Remarkably, a combination of high osmolarity and high temperature reduced the capacity of H-NS to repress *hilA*. These results can be interpreted as temperature and osmolarity influencing the physicochemical properties of the DNA or the H-NS protein itself and partially alleviating H-NS silencing of *hilA*. Nevertheless, complete alleviation of H-NS-mediated *hilA* silencing also required that cells enter the stationary phase. This suggests that factors other than temperature or osmolarity, such as proteins that exhibit anti-H-NS activity, might play a role in alleviating *hilA* silencing.

Stationary phase induction of *hilA* in strain SV5015 requires IHF

We next tested the hypothesis that cellular factors that antagonize H-NS *hilA* silencing account for *hilA* derepression in cells growing in LB medium at 37 °C and entering the stationary phase. It has been shown that IHF plays a critical role in the expression of genes required by *S. Typhimurium* to undergo the physiological changes associated with the transition from the exponential to the stationary phase of growth, including virulence gene expression (Mangan *et al.*, 2006). Among others, *hilA* and several other SPI1 genes are downregulated in both *ihfA* and *ihfB* mutant derivatives of strain SL1344. Moreover, it is well known that HilD, HilC and RtsA are required for proper *hilA* induction in cells growing aerobically in LB medium and entering the stationary phase. Therefore, we hypothesized that either the HilD-HilC-RtsA regulatory cascade or IHF could play a role

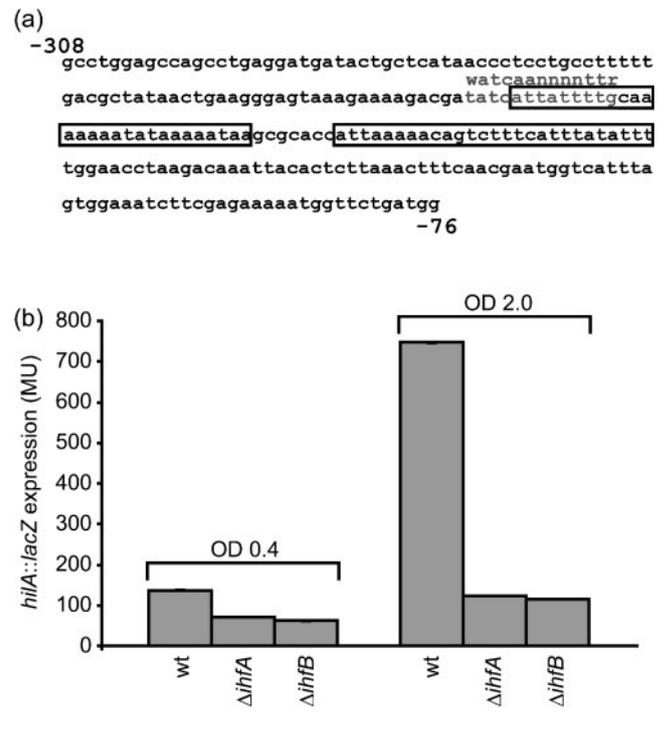


Fig. 4. Effect of *ihfA* and *ihfB* alleles on growth phase-dependent *hilA* induction. (a) Schematic illustration of a partial sequence of the *hilA* promoter. Numbers indicate the distance from the transcriptional start site. The boxes indicate the H-NS-binding sites (Olekhovich & Kadner, 2006) and the nucleotides shown in grey type indicate the putative IHF-binding site found using Virtual Footprint software (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>). The consensus sequence in grey type is shown above the putative IHF-binding site (WATCAANNNTTR, where W is an A or T, N is any of four nucleotides and R is an A or G). (b) Cells from LB cultures grown at 37 °C were harvested at the exponential and early stationary phases of growth and β -galactosidase activity (in Miller units; MU) was monitored. The data shown are the means and SDs of three independent experiments.

in antagonizing H-NS silencing of *hilA* to promote its expression under permissive conditions. To further address this question, we first tried to construct double *hilC hns*, *hilD hns* and *hns ihf* null mutants. Whereas *hilA* induction at the onset of the stationary phase should be abolished in mutants lacking the hypothetical H-NS antagonist, the combination of the *hns* allele with a mutant allele in the gene encoding the H-NS antagonist would restore *hilA* induction. Double *hilC hns* and *hilD hns* mutants could be easily constructed; however, a double *hns ihf* mutant appeared not to be viable in strain SV5015. As an alternative, we decided to partially interfere with H-NS activity by expressing the H-NST_{EPEC} protein. This protein corresponds to a naturally occurring truncated form of the H-NS protein that acts as an H-NS antagonist (Williamson & Free, 2005). Hence, *hilA* transcription in *hilC/hilD* or *ihf* mutants would correspondingly increase when H-NS activity was reduced by expressing H-NST_{EPEC} only if HilC, HilD or IHF acted as an H-NS

antagonist. We first assessed *hilA* transcription in *hilD* and double *hilC hilD* mutants, either in an H-NS⁺ or in an H-NS reduced activity background (H-NST_{EPEC} expressed). To achieve this, the mutants were transformed with plasmid pBADHNS_t, which encodes the arabinose-inducible truncated form of the H-NS protein that exhibits anti-H-NS activity (Williamson & Free, 2005). The effect of the expression of H-NST_{EPEC} protein on *hilA* expression was monitored in cells growing in LB medium at 37 °C (Table 2). Antagonizing with H-NS either in the *hilD* or in the double *hilC hilD* mutant did not result in *hilA* induction in cells entering the stationary phase. These results coincide with those reported for *S. Typhimurium* strain LT2 (Olekhovich & Kadner, 2006).

We next tested the role of IHF in stationary phase-dependent *hilA* induction. A putative IHF-binding site was detected upstream of *hilA* (Fig. 4a). *ihfA* and *ihfB* derivatives of strain SV5015 were constructed and *hilA* expression was studied (Fig. 4b). When cells were grown in LB medium at 37 °C, at stationary phase, *hilA* induction did not take place in cells lacking either of the two IHF subunits. Under other growth conditions (low temperature, low osmolarity), neither of the two *ihf* mutant alleles modified *hilA* expression (data not shown). We next studied *hilA* expression in cells lacking IHF and exhibiting a reduced H-NS activity. Interestingly, a partial inhibition of H-NS activity in cells lacking IHF resulted in a significant induction of *hilA* expression, up to about 50 % of the expression obtained in the wt cells (Table 2). These *in vivo* results suggest that, at least under certain environmental conditions (high temperature and osmolarity, cells entering the stationary phase), the presence of IHF antagonizes H-NS-mediated *hilA* silencing.

In vitro binding of H-NS and IHF to the *hilA* regulatory region

To further test the hypothesis that IHF interferes with H-NS-mediated silencing of *hilA*, we performed competitive

EMSA between H-NS and IHF on the *hilA* promoter region. A 877 bp fragment spanning from -505 to +372, which contains the putative IHF-binding site, was used (see Fig. 4a). The DNA was incubated with the lowest concentrations of either H-NS or IHF that gave a complete shift of free DNA (1 or 0.16 µM, respectively). After 15 min at 37 °C, increasing amounts of the other protein were added, and incubation was continued for an additional 15 min. When H-NS was prebound to DNA, addition of increasing amounts of IHF generated lower-migrating protein-DNA complexes until a fragment was obtained with a mobility similar to that of the IHF and DNA complex. In contrast, when IHF was prebound to DNA, addition of increasing amounts of H-NS did not alter the mobility of protein-DNA complexes (Fig. 5).

IHF alleviates H-NS-mediated repression of *hilA* transcription

The effect of *ihfA* or *ihfB* mutant alleles on *hilA* expression in cells growing in LB medium and entering the stationary phase, the effect on *hilA* transcription of the H-NS antagonist in double *ihf hns* mutants, as well as the gel-shift data presented above suggest that the IHF protein functions as a transcriptional regulator of the *hilA* gene. To determine the effect of IHF on *hilA* transcription, *in vitro* transcription assays, using purified recombinant H-NS and IHF proteins, were performed on the *hilA* promoter (Fig. 6). First of all, increasing concentrations of H-NS repressed *hilA* expression. Addition of 1 µM H-NS resulted in a 4.7-fold repression of transcription. To test the effect of increasing concentrations of IHF on the yield of transcripts from the *hilA* promoter, the concentration of H-NS was fixed at 1 µM. Quantification of the transcripts showed that the presence of 0.5 µM IHF in the transcription assay did not have a stimulatory effect in the absence of H-NS. Nevertheless, when IHF was present at 0.5 µM in the reaction mix, it stimulated transcription twofold in the presence of 1 µM H-NS. The increase in the degree of

Table 2. Effect of expression of the H-NST_{EPEC} protein from plasmid pBADHNS_t in cells harbouring the *hilD*, *hilC*, *ihfA* and *ihfB* mutations

Strain genotype	β -Galactosidase activity*		Ratio†	
	LB	LB, 0.02 % L-Ara	LB	LB, 0.02 % L-Ara
<i>hilA-lacZYA</i>	1191	1059	1	1
<i>hilA-lacZYA</i> pBAD18	1155	1163	0.97	1.1
<i>hilA-lacZYA</i> Δ <i>hilD</i> :: Cm pBADHNS _t	150.2	153.0	0.13	0.14
<i>hilA-lacZYA</i> Δ <i>hilC</i> Δ <i>hilD</i> :: Cm pBADHNS _t	154.4	132.4	0.13	0.12
<i>hilA-lacZYA</i> Δ <i>ihfA</i> :: Cm pBADHNS _t	295.9	611.7	0.25	0.58
<i>hilA-lacZYA</i> Δ <i>ihfB</i> :: Cm pBADHNS _t	301.1	508.8	0.25	0.48

* β -Galactosidase activities (Miller units; MU) were measured after growth to early stationary phase (OD₆₀₀ 2.0) in LB medium or LB + 0.02 % L-arabinose at 37 °C.

†The ratio was calculated by dividing the β -galactosidase value of the strain with a plasmid (pBAD18 or pBADHNS_t) by that of its cognate wt (*hilA-lacZYA*) parent.

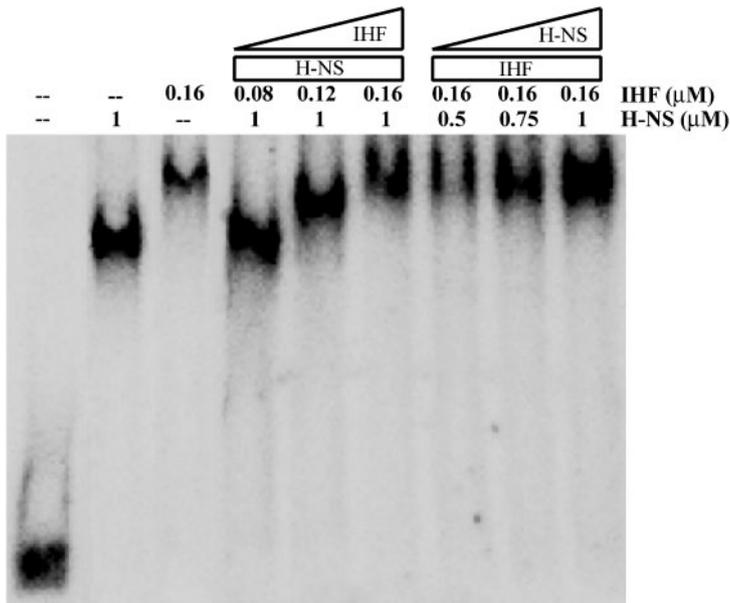


Fig. 5. EMSA for H-NS/IHF binding to the *hilA* promoter. The promoter fragment from positions -505 to +372 was incubated with H-NS, IHF or mixtures of the two proteins, either at a fixed concentration of IHF (0.16 μM) and increasing concentrations of H-NS (0–1 μM), or at a fixed concentration of H-NS (1 μM) and increasing amounts of IHF (0–0.16 μM). EMSA was performed at 37 °C. Experiments were performed in triplicate, and the image shows a representative example.

stimulation in the presence of H-NS indicates that *in vitro*, IHF can alleviate H-NS-mediated repression of *hilA* transcription.

DISCUSSION

In this report we present data that help to clarify the role of H-NS and Hha proteins in environmental- and growth phase-dependent *hilA* modulation in *S. Typhimurium* strain SV5015. Regulation of *hilA* in *S. Typhimurium* represents an interesting example of the wide variety of stimuli that can affect virulence gene regulation and how complex some bacterial regulatory cascades turn out to be. In spite of the fact that several reports have shown that Hha, H-NS or an H-NS/Hha complex influences *hilA* expression (Fahlen *et al.*, 2001; Olekhovich & Kadner, 2006; Schechter *et al.*, 2003), information integrating the role of H-NS/Hha-mediated *hilA* modulation in the bacterial response to different environmental inputs is

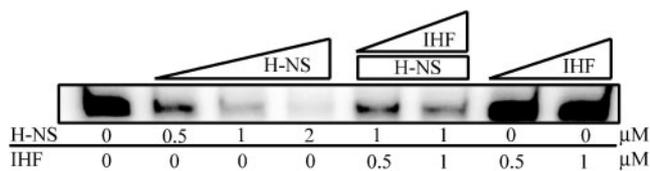


Fig. 6. Effect of H-NS and IHF on the *hilA* promoter. The *in vitro* transcription assay was performed in the presence of H-NS and IHF simultaneously or separately. H-NS and IHF concentrations used are shown. The products of the *in vitro* transcription of the promoters indicated were detected by primer extension analysis and electrophoresed on a 12% denaturing polyacrylamide gel. Experiments were performed in triplicate, and the image shows a representative example.

not yet available. The pre-existing data have shown a role for H-NS/Hha in repressing *hilA* at low osmolarity (Olekhovich & Kadner, 2006); however, H-NS and Hha differentially modulate *hilA* at high osmolarity. The reason for the latter effect remained to be clarified.

Both low temperature and low osmolarity represent non-permissive conditions for the expression of several virulence determinants in pathogens such as *Salmonella* and *E. coli*. Silencing of these determinants by H-NS or H-NS/Hha is a well-characterized process (Ellison & Miller, 2006; Goosen & van de Putte, 1995; Nieto *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 2005). Our work shows that H-NS and Hha repress *hilA* under a set of well-defined environmental and physiological conditions and consequently account for SPI1 gene silencing. Low salt, low temperature or both environmental conditions together dictate H-NS/Hha-mediated *hilA* silencing. A recent report has shown that temperature, pH and ionic strength influence the ability of H-NS to switch between two different DNA-binding models (Liu *et al.*, 2010). Low salt, low pH and low temperature would result in H-NS polymerization along a stretch of DNA, elongation and no folding (the ‘stiffening mode’). An increase in pH or ionic strength would lead to a transition from the stiffening mode to the classical bridging model, in which H-NS binds DNA and promotes looping (Dame *et al.*, 2006). In the latter mode, H-NS would be insensitive to temperature changes (Liu *et al.*, 2010). These data, obtained by a combination of atomic force microscopy and single-molecule experiments, are in accordance with the observed influence of temperature and osmolarity on the ability of H-NS to repress gene expression, of which *hilA* is a good example.

In addition to responding to osmolarity or temperature shifts, the gene expression of virulence traits also requires the input of several other stimuli. Anti-silencing is a

well-characterized process that overcomes H-NS-mediated repression of several operons under specific physiological conditions (Stoebel *et al.*, 2008). The RovA and Ler proteins have been shown to counteract H-NS-mediated silencing in *Yersinia enterocolitica* and *E. coli*, respectively (Bustamante *et al.*, 2001; Ellison & Miller, 2006). In *Salmonella*, H-NS silencing of SPI-2 is antagonized by HilD or by SsrB proteins in response to different environmental conditions (Walthers *et al.*, 2007, 2011; Bustamante *et al.*, 2008). It has been reported before that IHF antagonizes H-NS-dependent repression. A classical example is that of transcription from the Pe promoter of phage Mu, which is directly stimulated by IHF (Krause & Higgins, 1986). It has also been shown that IHF activates Pe transcription indirectly via the alleviation of H-NS-mediated repression (van Ulsen *et al.*, 1996). Recent reports further reinforce the role of IHF in alleviating H-NS silencing in *Vibrio cholerae* (Stonehouse *et al.*, 2008) and in the *csgD* operon of *E. coli* (Ogasawara *et al.*, 2010).

In this work, we provide genetic and biochemical evidence indicating that IHF plays a key role in alleviating H-NS silencing in the *hilA* promoter. *In vivo* data show that, under specific environmental and physiological conditions (permissive conditions), IHF is required for *hilA* induction. Interference with H-NS activity compensates for the absence of IHF in *ihf* mutants. EMSA experiments suggest that binding of IHF to the *hilA* regulatory region might abolish H-NS binding and hence the silencing of such a promoter region. Finally, *in vitro* transcription data show that IHF interferes with H-NS repression of *hilA*. Our results link previous reports that show the roles of H-NS in modulating *hilA* (Olekhovich & Kadner, 2006) and of IHF in modulating stationary phase-dependent virulence expression in *Salmonella* (Mangan *et al.*, 2006). By growing cells in aerated LB medium, we show that H-NS silencing of *hilA* ceases at the onset of the stationary phase, and in addition that IHF is required to alleviate H-NS silencing under these physiological conditions.

The results presented here provide evidence indicating that outside the host (i.e. low-temperature and/or low-osmolarity conditions), H-NS is a key element in silencing unwanted expression of the SPII genes. The Hha protein enhances the silencing effect of H-NS on *hilA*. Within the host, the combination of modified environmental factors (among others, increased temperature and osmolarity) and the activity of IHF abolish H-NS silencing of *hilA*. Thereafter, the regulatory cascade including HilD, HilC, RtsA, ppGpp and other regulatory factors, in response to several other signals, dictates *hilA* expression levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (CSD2008-00013 and BIO2007-64637) and from the Generalitat de Catalunya (2009SGR66). M.H.Q. was supported by the Programme Alfan, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship no. E06D101038BR. The authors thank F. de la Cruz for the IHF protein.

REFERENCES

- Altier, C. (2005). Genetic and environmental control of *salmonella* invasion. *J Microbiol* **43** (Spec. no.), 85–92.
- Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C. A. (1995). *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**, 715–727.
- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. (1996). Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703–714.
- Balsalobre, C., Juárez, A., Madrid, C., Mouriño, M., Prenafeta, A. & Muñoz, F. J. (1996). Complementation of the *hha* mutation in *Escherichia coli* by the *ymoA* gene from *Yersinia enterocolitica*: dependence on the gene dosage. *Microbiology* **142**, 1841–1846.
- Baños, R. C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C. & Juárez, A. (2009). Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genet* **5**, e1000513.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L. & Jones, B. D. (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**, 1295–1305.
- Bolívar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. & Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95–113.
- Browning, D. F., Grainger, D. C. & Busby, S. J. (2010). Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* **13**, 773–780.
- Bullas, L. R. & Ryu, J. I. (1983). *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r⁻ m⁺ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J Bacteriol* **156**, 471–474.
- Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E. & Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**, 664–678.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. & Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14591–14596.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14.
- Chubiz, J. E., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D. & Slauch, J. M. (2010). FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **192**, 6261–6270.
- Collazo, C. M. & Galán, J. E. (1997). The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. *Gene* **192**, 51–59.
- Dame, R. T., Noom, M. C. & Wuite, G. J. (2006). Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**, 387–390.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645.
- Dorman, C. J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**, 391–400.
- Ellermeier, C. D. & Slauch, J. M. (2004). RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol* **186**, 68–79.

- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2007). Adaptation to the host environment: regulation of the SPII type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**, 24–29.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008). Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476–486.
- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A. & Slauch, J. M. (2002). Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**, 153–161.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2005). HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPII type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**, 691–705.
- Elliott, T. & Geiduschek, E. P. (1984). Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a “–35” region. *Cell* **36**, 211–219.
- Ellison, D. W. & Miller, V. L. (2006). H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**, 5101–5112.
- Fahlen, T. F., Wilson, R. L., Boddicker, J. D. & Jones, B. D. (2001). Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* **183**, 6620–6629.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. & Gualerzi, C. O. (1998). Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* **17**, 7033–7043.
- Goosen, N. & van de Putte, P. (1995). The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* **16**, 1–7.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121–4130.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A. & Bertin, P. (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**, 20–36.
- Hulton, C. S., Seirafi, A., Hinton, J. C., Sidebotham, J. M., Waddell, L., Pavitt, G. D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. & Higgins, C. F. (1990). Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**, 631–642.
- Jones, B. D. & Falkow, S. (1994). Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* **62**, 3745–3752.
- Krause, H. M. & Higgins, N. P. (1986). Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor. *J Biol Chem* **261**, 3744–3752.
- Lee, C. A., Jones, B. D. & Falkow, S. (1992). Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1847–1851.
- Liu, Y., Chen, H., Kenney, L. J. & Yan, J. (2010). A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev* **24**, 339–344.
- López-Garrido, J. & Casadesús, J. (2010). Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* **184**, 637–649.
- Lucas, R. L. & Lee, C. A. (2001). Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**, 2733–2745.
- Madrid, C., Nieto, J. M., Paytubi, S., Falconi, M., Gualerzi, C. O. & Juárez, A. (2002). Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **184**, 5058–5066.
- Madrid, C., Balsalobre, C., García, J. & Juárez, A. (2007). The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol Microbiol* **63**, 7–14.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. O., Hinton, J. C. & Dorman, C. J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**, 1831–1847.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**, 145–156.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**, 4187–4189.
- Nieto, J. M., Carmona, M., Bolland, S., Jubete, Y., de la Cruz, F. & Juárez, A. (1991). The *hha* gene modulates haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 1285–1293.
- Nieto, J. M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J. L., Rodríguez, S. & Juárez, A. (2002). Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J Bacteriol* **184**, 629–635.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010). Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology* **156**, 2470–2483.
- Olekhovich, I. N. & Kadner, R. J. (2006). Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **357**, 373–386.
- Ono, S., Goldberg, M. D., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J. C. & Ladbury, J. E. (2005). H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* **391**, 203–213.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schechter, L. M., Jain, S., Akbar, S. & Lee, C. A. (2003). The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**, 5432–5435.
- Schmidt, H. & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**, 14–56.
- Song, M., Kim, H. J., Kim, E. Y., Shin, M., Lee, H. C., Hong, Y., Rhee, J. H., Yoon, H., Ryu, S. & other authors (2004). ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Biol Chem* **279**, 34183–34190.
- Sternberg, N. L. & Maurer, R. (1991). Bacteriophage-mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol* **204**, 18–43.
- Stoebel, D. M., Free, A. & Dorman, C. J. (2008). Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**, 2533–2545.
- Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R. K. & Skorupski, K. (2008). Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **190**, 4736–4748.

van Ulsen, P., Hillebrand, M., Zulianello, L., van de Putte, P. & Goosen, N. (1996). Integration host factor alleviates the H-NS-mediated repression of the early promoter of bacteriophage Mu. *Mol Microbiol* **21**, 567–578.

Vivero, A., Baños, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., García-del Portillo, F., Juárez, A. & Madrid, C. (2008). Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **190**, 1152–1156.

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

Walthers, D., Li, Y., Liu, Y., Anand, G., Yan, J. & Kenney, L. J. (2011). *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* **286**, 1895–1902.

Williamson, H. S. & Free, A. (2005). A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic *Escherichia coli* acts as an H-NS antagonist. *Mol Microbiol* **55**, 808–827.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119.

Edited by: V. J. Cid