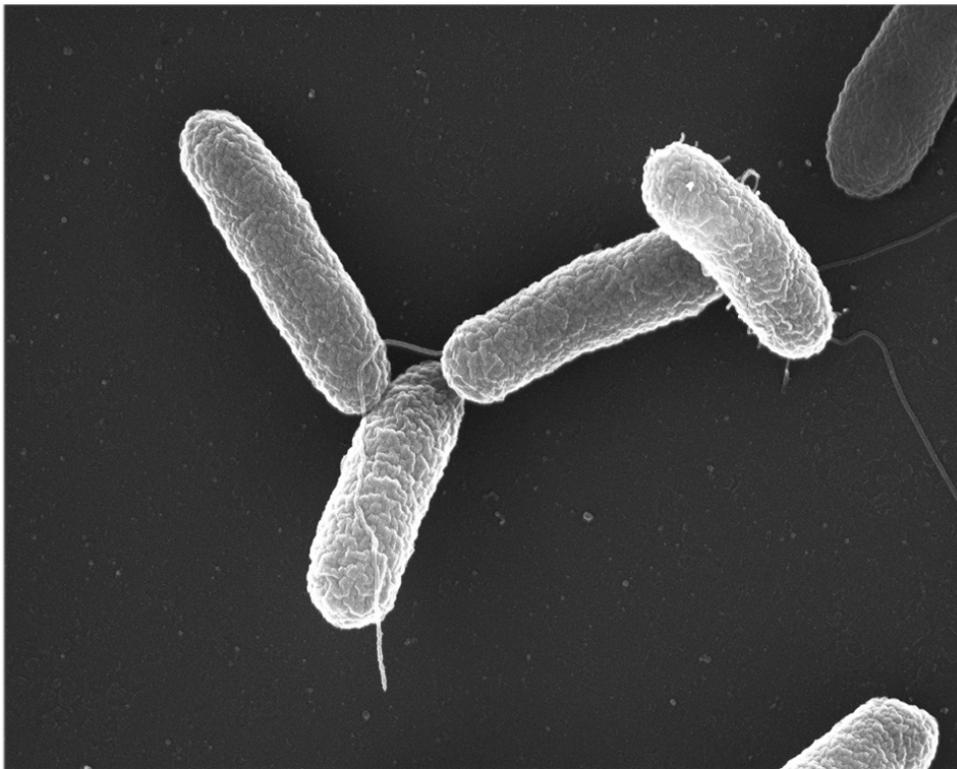




Departamento de Genética
Universidad de Sevilla

**Contribución del regulón Rcs a la virulencia de *Salmonella*:
análisis genético y molecular**



Clara Beatriz García Calderón

Tesis Doctoral

2008

Departamento de Genética
Universidad de Sevilla



**Contribución del regulón Rcs a la
virulencia de *Salmonella*:
análisis genético y molecular**

*Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctora en Biología*

Clara Beatriz García Calderón
Sevilla, Noviembre 2008

Clara Beatriz García Calderón

Vº Bº:

Dr Francisco Ramos Morales

Dr Josep Casadesús Pursals

Directores de la Tesis

“No sé lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí”

Isaac Newton

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:
la voluntad”*

Albert Einstein

A mi familia

Ahora que ya veo el final de este largo camino, es cuando echo la vista atrás y me acuerdo de aquellos primeros momentos en el departamento, siendo incluso alumna interna, en los que cada cosa que aprendía era algo fascinante. Espero que ese interés perdure siempre, a pesar del tiempo que ha transcurrido y del cambio que pueda haber en mí. También me acuerdo de todas aquellas personas que me han acompañado, y que de una forma u otra me han marcado y me han ayudado a crecer, tanto en el trabajo como fuera de éste. Es el momento de agradecerles esa ayuda, aunque espero que la mayoría ya sepáis lo que os quiero decir, ya que hay cosas para las que no hacen falta las palabras.

En primer lugar quiero agradecerle a Pepe Casadesús la oportunidad que me dio de entrar en su grupo. Gracias por contagiarme el entusiasmo por la ciencia, por estar siempre dispuesto a discutir los resultados y por seguir confiando en mí.

También a Paco Ramos agradecerle todos estos años de dedicación y esfuerzo para que esta tesis llegara a buen puerto. Espero que algo de tu organización y método se me haya pegado, y sea capaz de poner orden en mi caos.

A los compañeros de grupo, a los que estuvieron y a los que están. Decirles que en estos años he encontrado en ellos mucho más que unos compañeros de trabajo, y sé que entre ellos tengo a algunos de mis mejores amigos. En estos años hemos pasado muy buenos momentos, tanto dentro como fuera del laboratorio, y otros no tan buenos, pero que con la compañía de todos lo hemos llevado mejor. Espero seguir contando con vosotros muchos años más, y que se cumpla de verdad, y no se queden en simples palabras.

A Eva agradecerle que me ayudara a dar mis primeros pasos en la ciencia, y que tuviera tanta paciencia al enseñarme a hacer las primer extension. Eres de esa clase de personas que consiguen contagiar el entusiasmo por este trabajo.

Anabel, mi "hermanita mayor", que se hizo cargo de todos nosotros cuando Eva se fue. Gracias por estar siempre ahí cuando te he necesitado, por ser una buena amiga. Espero que algo de tu disciplina se me haya pegado.

Anita, qué te puedo decir que tú no sepas. Tú fuiste la que me convenciste de hacer la tesis, así que en cierto modo esto te lo debo a ti. Sin tu amistad, estas horas en el laboratorio no hubieran sido lo mismo. Espero que no cambies nunca, y que siempre nos sigas contagiando con tu buen humor y tus bromas. Nos esperan muchas más cosas por compartir, porque esto no acaba aquí. Gracias por ser así.

Meritxell, una de las personas más pacientes que conozco, y también una de las más constantes. Gracias por ser tan buena con todos nosotros. Recuerda que tú eres la próxima, así que mucho ánimo.

Juaki, el más bromista de todos. Desde tu llegada al grupo le diste ese puntito de chispa con el que tanto nos hemos reído. Gracias por tu ayuda y por ser tan buen compañero. Espero que te vaya muy bien, que ya va quedando poquito, y que me sigas gastando tus típicas bromas, porque siempre lo eran, ¿no?, ¡¡jeje!!

Robe, el único que ha conseguido que pierda los nervios, pero también uno de los que más me ha hecho reír, quizás siempre hemos estado en los extremos. Gracias por ayudarme a discutir los resultados, incluso los que parecían que no tenían ni pies ni cabeza.

Marcello, el más halagador de todos, gracias por levantarme el ánimo cada mañana. Gracias por dejar que te conociera, al menos un poquito. Aprovecha el tiempo que te queda de tesis y disfruta, creo que es una oportunidad muy buena.

Javi, eres el que más me sorprende. ¡Con lo serio que parecías cuando viniste la primera vez, y las bromas que nos gastas ahora! Eres un crack, así que seguro que todo te va a ir fenomenal. Gracias por hacerme pensar siempre más allá todos mis resultados, y por esas risas que hemos echado.

Nacho, eres una persona muy especial. Gracias por todos estos momentos que hemos compartido, y por todas esas cosas que me has enseñado. Una de las personas más curiosas que conozco. Sigue adelante con optimismo, que nada es nunca tan malo como parece. ¡Y no dejes que se aprovechen de ti para hacer todas las cosas comunes!

Sarita, mi “ahijada” o hermanita pequeña. La más risueña de todos cuantos han pasado por aquí. Tu locura sólo es superada por tu alegría y tus ganas de ayudar a quien le haga falta. Gracias por esos ánimos, sobre todo en los meses de escritura, y por esas risas que nos hemos echado, espero que se puedan seguir repitiendo.

Elenita, contigo sigue vivo el espíritu de las bact, tú ya sabes. No sé si has aprendido rápido o venías ya enseñada. Aunque hemos compartido poquito tiempo, ha sido suficiente para saber que tengo en ti una gran amiga. Gracias por los buenos ratos.

Elena, la última en llegar. Contigo he coincidido muy poco, pero espero que podamos conocernos, y que llegues a ser una más de la familia “bacteria”.

Por supuesto, agradecerles también a otros miembros del departamento su ayuda, ya que de una forma u otra todos han puesto su granito de arena. A Machupi, Lola y Silvia, las veces que hemos quedado después del trabajo. A Fernandito, la organización de las salidas a la playa, con chistes incluidos. A Ale, mi compi de promoción, su amistad de tantos años. A Violeta, la alegría que desborda. A todos, Ana, Jesús, Rafa, Felipe, Leandro, Carmen, Víctor, Roberto, Humberto, Juanjo, Reyes, Douglas, los Rec, aunque ahora estén un poco lejos, gracias por los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio. A los más nuevos, que siguen el espíritu de compañerismo del departamento. Y cómo no, a todos aquellos que han pasado por aquí, pero que ya se fueron, Iván, More, Alfonso, Felipe, Laura, María. Durante estos años habéis sido como una familia para mí. Gracias.

A los profesores del departamento, que en la etapa de alumna me transmitieron la curiosidad por la investigación científica, y en especial, el interés por la genética, y en la etapa de doctorando han estado siempre dispuestos a escuchar las dudas y a ayudar en todo lo posible.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por su aportación económica para la realización de esta Tesis.

También a Pepe Córdoba y a Luis Romanco. Gracias por facilitarnos el trabajo, siempre pendientes de si hay tubos que lavar, y por animarnos cada mañana con vuestras bromas.

A las secretarias, las dos Ana, por hacernos fácil todo el tema del papeleo, tan incomprensible para nosotros, y siempre pendientes de que todos los papeles lleguen a tiempo.

Y por supuesto a Isabel, que con su alegría nos contagia de optimismo y está siempre pendiente de todos nosotros.

Fuera del departamento, también hay muchas personas a las que quiero agradecerles su apoyo y comprensión. Mis compañeras de la carrera, Ana, Ruth, y Rocío, que aunque las veo menos veces de las que me gustaría, siempre están ahí cuando las he necesitado. Vosotras además entendéis perfectamente lo que es esto, ya que estáis inmersas en la misma aventura. Magdalena y Belén, que a pesar de estar lejos mantenemos el contacto. A mis amigas de siempre, a Reyes, Elena y Esther, que sobre todo en estos últimos meses me han animado mucho en la escritura.

Y, por supuesto, siempre se deja para el final lo más importante. A mi familia. Gracias por vuestro apoyo y comprensión durante todos estos años. Sé que os cuesta entender que no tenga un horario como una persona normal, que los fines de semana también se puede trabajar, y todas las rarezas que conlleva este trabajo, pero aún así siempre me habéis animado a seguir con lo que me gusta. Gracias por ayudarme a desconectar del trabajo.

A mi padre, que aunque es una persona de pocas palabras, sé que nos apoya a todos. Gracias por tu esfuerzo para darnos todo lo que hemos necesitado.

A mi madre, que sé que siempre está ahí para lo que necesite, animándome y confiando en mí. Gracias por ser como eres y por haberme dado todo en tantos años.

A mis hermanas, por los buenos ratos pasados. A Alicia, siempre dispuesta a ayudar a quien la necesite. Gracias por preocuparte tanto. A Margarita, la más risueña. Eres la que mejor me entiende, gracias por las risas que nos echamos y porque sigues estando ahí, muy cercana, como si nada hubiera cambiado.

A Irene, la más cariñosa y sensible. Gracias por escucharme cuando lo he necesitado. Y a mi hermano Guillermo, el más bueno y bromista. Gracias por las risas, a pesar de hacerme rabiar, y por ser un auténtico crack. Gracias a todos por ser tan buenos, porque cada uno tiene algo único y especial, y por ser la mejor familia que se puede tener.

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El género <i>Salmonella</i>	3
2. Virulencia de <i>Salmonella</i>	4
2.1. Proceso de infección y modelos de estudio	4
2.2. Factores de virulencia e islas de patogenicidad	8
3. Los sistemas de dos componentes	10
3.1. Las proteínas sensoras	13
3.2. Los reguladores de respuesta	14
4. Evolución de los sistemas de dos componentes	16
5. Especificidad entre la quinasa y el regulador de respuesta	17
6. Los sistemas de dos componentes y la virulencia	20
6.1. Regulación de la virulencia en <i>Salmonella enterica</i>	21
7. El sistema Rcs	25
7.1. Miembros del sistema Rcs	27
7.2. Proteínas auxiliares del sistema Rcs e interacción con otros sistemas.....	29
7.3. Modo de acción de RcsB	31
7.4. Dianas conocidas del sistema Rcs	33
7.5. Activación del sistema Rcs	37
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. Material biológico	49
1.1. Estirpes bacterianas	49
1.2. Bacteriófagos	49
1.3. Plásmidos	49
2. Medios, soluciones y condiciones de cultivo	53
2.1. Condiciones de cultivo	53
2.2. Medios y soluciones	53
3. Transferencia genética	55
3.1. Transformación de <i>E. coli</i> con alta eficiencia	55
3.2. Electroporación en <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	56

3.3. Transducción	57
4. Otros métodos genéticos	60
4.1. Construcción de estirpes	60
4.2. Mutagénesis con <i>MudJ</i>	60
4.3. Mutagénesis con <i>Tn10dTc</i>	61
4.4. Obtención de colecciones (“pools”) de transductantes independientes	62
4.5. Mapeo por cotransducción	62
5. Ensayos de infección mixta	63
6. Manipulación de ácidos nucleicos	63
6.1. Extracción de ADN plasmídico para clonaciones	63
6.2. Extracción de ADN plasmídico para análisis de clones (boiling preps)	64
6.3. Extracción de ADN plasmídico para secuenciación	65
6.4. Extracción de ADN genómico	65
6.5. Extracción de ARN	65
6.6. Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN	66
6.7. Electroforesis convencional de ADN en agarosa	67
6.8. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	68
7. Detección de secuencias de ácido nucleico por hibridación	68
7.1. Transferencia de fragmentos de ADN separados por electroforesis a filtros de nailon	68
7.2. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina-dUTP	69
7.3. Hibridación ADN-ADN	69
7.4. Deshibridación de filtros de nailon	69
7.5. Detección de secuencias por hibridación con sondas no radiactivas	70
7.6. Marcado de oligonucleótidos con $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{-ATP}$	70
8. Secuenciación	71
8.1. Cebadores	71
8.2. Secuenciación	73
8.3. Análisis y comparación de secuencias	73

9. Caracterización de las inserciones de MudJ o Tn10dTc	74
9.1. Restricción, clonación y transformación	74
9.2. PCR inversa	74
10. Reacción en cadena de la polimerasa	77
11. Extensión de un cebador mediante transcriptasa inversa	77
12. Inactivación de genes cromosómicos usando productos de PCR	79
12.1. Preparación del ADN para la sustitución	80
12.2. Transformación de los receptores	81
12.3. Escisión del gen de resistencia a antibiótico	82
13. Construcción de fusiones <i>lac</i> usando el sistema λ Red y recombinación específica de sitio mediada por el sistema FLP	82
14. Ensayos de actividad β -galactosidasa	85
15. Construcción de proteínas de fusión con el epitopo 3xFLAG	86
16. Preparación de geles y condiciones de electroforesis de proteínas ..	87
16.1. Tinción de geles con azul de Coomassie	88
17. Inmunodetección de proteínas por hibridaciones western	89
18. Purificación de proteínas secretadas	90
RESULTADOS	93
Capítulo 1. Contribución del sistema Rcs a la virulencia de <i>Salmonella</i>	95
1.1. Aislamiento de mutantes Rcs constitutivos	97
1.2. Secuenciación de los mutantes <i>rsc</i>	99
1.3. Dominancia y recesividad de las mutaciones <i>rscC</i>	99
1.4. Frecuencia de reversión de los mutantes <i>rscC</i>	101
1.5. Nivel de activación del sistema Rcs en los distintos mutantes	101
1.6. Los mutantes <i>rscC</i> con activación constitutiva del sistema Rcs presentan un defecto de movilidad	102
1.7. El operón <i>flhDC</i> está reprimido en mutantes <i>rscC</i> constitutivos	103
1.8. Una mutación nula en <i>rscB</i> suprime la mucosidad, la falta de movilidad y la resistencia a mecillinam de los mutantes <i>rscC</i>	

constitutivos	104
1.9. Los mutantes <i>rscC</i> activados de manera constitutiva son avirulentos en ratones BALB/c	105
1.10. Los mutantes <i>rscC</i> constitutivos no tienen defecto de crecimiento <i>in vitro</i>	106
1.11. Una mutación nula en <i>rscB</i> suprime la avirulencia de los mutantes <i>rscC</i> constitutivos	107
1.12. Una mutación en <i>gmm</i> suprime parcialmente la avirulencia de los mutantes <i>rscC</i> constitutivos	108
Capítulo 2. Escrutinios genéticos para la identificación de genes regulados por Rcs y caracterización de los mismos	111
2.1. Escrutinios genéticos para la identificación de genes regulados por el sistema Rcs	113
2.2. Expresión de las fusiones obtenidas e identificación de inserciones en genes de cápsula y de flagelo	117
2.3. Caracterización de nuevos miembros del regulón Rcs	119
2.4. Características generales de los genes obtenidos en los escrutinios y estudio de su regulación transcripcional	120
2.5. Efecto de los genes identificados en el escrutinio sobre la virulencia de <i>Salmonella</i>	131
Capítulo 3. El operón <i>srfABC</i>	133
3.1. Los genes <i>srf</i> están regulados transcripcionalmente por el sistema Rcs	135
3.2. Expresión diferencial de los genes <i>srf</i> según las condiciones de cultivo	138
3.3. Secreción de las proteínas SrfA, SrfB y SrfC	141
3.4. Ensayos de virulencia del operón <i>srfABC</i>	143
3.5. Solapamiento parcial entre los regulones Rcs y PhoPQ	144
Capítulo 4. El gen <i>igaA</i>	147
4.1. Análisis molecular del gen <i>igaA</i>	149

4.2. Búsqueda de reguladores de <i>igaA</i>	154
4.3. Estudio del papel del gen <i>mviA</i> en la regulación de <i>igaA</i> y del sistema Rcs	158
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA	189

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

I.1. Modelo animal para el estudio de la patogénesis de <i>Salmonella</i>	7
I.2. Esquema general de los sistemas de dos componentes	11
I.3. Esquema de un sistema de dos componentes con más de dos proteínas	12
I.4. Organización de los dominios en las histidinas-quinzas	13
I.5. Esquema de la conexión entre dos sistemas de dos componentes ..	20
I.6. Representación esquemática de la red de regulación que controla la expresión de los genes de virulencia de <i>S. enterica</i>	25
I.7. Análisis comparativo del <i>locus rcs</i> en la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	26
I.8. Organización de los dominios de la proteína RcsC	27
I.9. Organización de los dominios de la proteína RcsD	28
I.10. Organización de la proteína RcsB	29
I.11. Esquema de la organización jerárquica de la expresión de los genes flagelares	35
I.12. Ruta de activación del sistema Rcs	42
M.1. Obtención de inserciones del transposón defectivo <i>MudJ</i>	61
M.2. Caracterización de las inserciones <i>MudJ</i> por PCR inversa	76
M.3. Representación esquemática del sistema de inactivación de genes mediante productos de PCR.....	80
M.4. Esquema de la construcción de las fusiones transcripcionales <i>lac</i> en el cromosoma	84
M.5. Construcción de proteínas de fusión con el epitopo 3XFLAG	87
C1.1. Comparación del crecimiento en placa de la estirpe silvestre y uno de los mutantes mucosos aislados en este Tesis	97
C1.2. Organización de los genes <i>rcs</i> y <i>ompC</i> en el genoma de <i>Salmonella</i>	98
C1.3. Representación esquemática de la proteína RcsC de <i>Salmonella</i> .	99
C1.4. Nivel de activación del sistema Rcs en los distintos mutantes ...	102
C1.5. Ensayo de movilidad de la estirpe silvestre y el mutante <i>rcsC55</i>	103
C1.6. Efecto de las mutaciones <i>rcsC</i> constitutivas sobre la expresión de <i>flhDC</i>	104
C1.7. Los mutantes <i>rcsC</i> constitutivos están atenuados en ratones ...	105

C1.8. Índice de competitividad <i>in vitro</i> de los mutantes <i>rscC</i> constitutivos frente a la estirpe silvestre.....	106
C1.9. Una mutación nula en <i>rscB</i> suprime la atenuación de los mutantes <i>rscC</i> constitutivos	107
C1.10. La superproducción de cápsula contribuye a la atenuación de los mutantes <i>rscC</i> constitutivos.....	110
C2.1. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar genes regulados por IgaA.....	115
C2.2. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar genes regulados por RcsB	116
C2.3. Actividad β -galactosidasa del gen <i>bapA</i> en distintos fondos genéticos.....	121
C2.4.a. Esquema representativo de un sistema de secreción tipo I.....	122
C2.4.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>siiE</i> en distintos fondos genéticos.....	122
C2.5.a. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram-negativas	123
C2.5.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>yjbH</i> en distintos fondos genéticos.....	123
C2.6. Actividad β -galactosidasa del gen <i>yiaD</i> en distintos fondos genéticos.....	124
C2.7.a. Esquema de la cascada de la señal en la quimiotaxia	124
C2.7.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>trg</i> en distintos fondos genéticos.....	125
C2.8.a. Esquema de la cascada de señalización en la que interviene la proteína NarH	125
C2.8.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>narH</i> en distintos fondos genéticos.....	125
C2.9.a. Esquema de la función de la proteína DcuB	126
C2.9.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>dcuB</i> en distintos fondos genéticos.....	126
C2.10.a. Esquema del papel de MelB.....	127
C2.10.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>melB</i> en distintos fondos genéticos.....	127

C2.11.a. Papel de la proteína YhhJ como transportador.....	127
C2.11.b. Actividad β -galactosidasa del gen <i>yhhJ</i> en distintos fondos genéticos	128
C2.12. Actividad β -galactosidasa del gen STM1491 en distintos fondos genéticos	128
C2.13.a. Hipotética reacción llevada a cabo por el producto del gen STM2176	129
C2.13.b. Actividad β -galactosidasa del gen STM2176 en distintos fondos genéticos.....	129
C2.14. Actividad β -galactosidasa del gen PSLT071 en distintos fondos genéticos	130
C2.15.a. Virulencia de los mutantes reprimidos por RcsB encontrados en el escrutinio.....	132
C2.15.b. Virulencia de los mutantes activados por RcsB encontrados en el escrutinio.....	132
C3.1. Regulación de los genes <i>srf</i> por el sistema Rcs.....	137
C3.2. Regulación de los genes <i>srfA</i> , <i>srfB</i> y <i>srfC</i> por el sistema Rcs a nivel de proteína.....	137
C3.3. Esquema simplificado de la regulación de las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2 (SPI-2)	138
C3.4. Represión transcripcional de <i>srfABC</i> por PhoPQ	140
C3.5. Regulación de los niveles de SrfC-3xFLAG por PhoP	141
C3.6. Ensayo de secreción de las proteína Srf.....	143
C3.7. Ensayos de virulencia de los genes <i>srfA</i> y <i>srfB</i>	144
C3.8. Solapamiento de los sistemas Rcs y PhoPQ en el control de la virulencia	145
C3.9. Regulación transcripcional de genes relacionados con la virulencia de <i>Salmonella</i> por los sistemas Rcs y PhoPQ.....	146
C4.1. Determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>igaA</i>	150
C4.2. La transcripción de <i>igaA</i> depende de RpoD	152
C4.3. <i>igaA</i> es el primer gen de un operón.....	154
C4.4. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar	

reguladores del gen <i>igaA</i>	156
C4.5. Expresión de <i>igaA</i> en Iso mutantes obtenidos en el escrutinio ...	157
C4.6. El efecto de <i>mviA</i> sobre <i>igaA</i> está mediado por RpoS	159
C4.7. H-NS y PhoPQ regulan la transcripción de <i>igaA</i>	161
C4.8. MviA controla la expresión de los genes del flagelo por medio de RcsB	162
C4.9. El mutante <i>mviA</i> es inmóvil.....	163
C4.10. Una mutación nula en <i>rscB</i> suprime el fenotipo de colonia pequeña del mutante <i>mviA</i>	164
C4.11. Una mutación en <i>rscB</i> suprime, aunque parcialmente, la atenuación del mutante <i>mviA</i>	165
C4.12. MviA controla la expresión de los genes del flagelo por una vía independiente de RpoS, IgaA y RcsC	166
C4.13. La inmovilidad del mutante <i>mviA</i> no es suprimida por mutaciones en <i>rscC</i> , sobreexpresión de <i>igaA</i> o mutaciones en <i>rpoS</i>	167
C4.14. La proteína MviA no afecta a la expresión de <i>rscB</i>	168
C4.15. La proteína RcsB es más estable en fondo mutante <i>mviA</i>	168
D.1. Modelo de regulación del sistema Rcs y la proteína IgaA por elementos externos al sistema, y regulación entre ellos.....	184

TABLAS

M.1. Estirpes bacterianas.....	49
M.2. Plásmidos	52
M.3. Concentraciones de agentes selectivos y otros compuestos químicos	55
M.4. Relación de oligonucleótidos usados en esta Tesis	71
C1.1. Resumen de las características de los mutantes <i>rscC</i> activados de forma constitutiva	100
C2.1. Tabla resumen de las inserciones obtenidas en el escrutinio	117
C2.2. Resumen de los candidatos obtenidos en el escrutinio	119
C4.1. Resultados obtenidos en el escrutinio	157

INTRODUCCIÓN

1. EL GÉNERO *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos móviles Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Salmonella* se encuentra filogenéticamente próximo a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*. A gran escala, la organización del genoma de *Salmonella* es similar a la de *Escherichia coli* (Groisman y Ochman 1994, Sanderson *et al.* 1995). La secuenciación ha demostrado que la similitud media entre los genomas de *E. coli* no patogénica y *S. enterica* serovar Typhimurium alcanza el 80 % (Blattner *et al.* 1997, McClelland *et al.* 2001). Sin embargo, *Salmonella* contiene regiones específicas que no se encuentran en otros géneros cercanos. Algunas de estas regiones están relacionadas con la patogenicidad y reciben el nombre de “islas de patogenicidad”, como luego se comentará.

El género *Salmonella*, según una clasificación basada en filogenia molecular, se divide en tres especies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterranea* (Reeves *et al.* 1989, Shelobolina *et al.* 2004). A su vez, *Salmonella enterica* se divide en siete grupos filogenéticos, las subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII. Los miembros de cada subespecie se clasifican en serovares. Mientras que *Salmonella bongori* y las subespecies de *Salmonella enterica* II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII se encuentran asociadas principalmente con vertebrados de sangre fría, los miembros de la subespecie I, que incluye más de 1300 serotipos, se aíslan más frecuentemente de aves y mamíferos (Boyd *et al.* 1996, Baumler *et al.* 1998)

2. VIRULENCIA DE *Salmonella*

2.1. Proceso de infección y modelos de estudio

En humanos y animales domésticos y de granja, la infección de *Salmonella* se inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados, habitualmente crudos o poco cocinados. Dependiendo del hospedador y del serovar, la infección puede causar una enfermedad sistémica, una gastroenteritis o un aborto. Ocasionalmente, las infecciones agudas pueden convertirse en persistentes, con carácter temporal o indefinido (“infecciones crónicas”).

La fiebre tifoidea es una infección sistémica producida por *Salmonella enterica* serovar Typhi y serovar Paratyphi. Las manifestaciones clínicas de la infección incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea transitoria o estreñimiento y, ocasionalmente, erupción maculopapular. Esta infección afecta anualmente a alrededor de 16 millones de personas en todo el mundo, llegando a causar alrededor de 600.000 muertes (OMS 1997). Se produce principalmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, y se debe a deficiencias sanitarias (ej: en la potabilización del agua) y a la manipulación y conservación de alimentos en condiciones antihigiénicas.

Aproximadamente, un 3-5% de los individuos infectados con *S. enterica* serovar Typhi se convierten en portadores crónicos asintomáticos, y la vesícula biliar suele ser el órgano habitual donde persiste la infección. Datos recientes sugieren la existencia de reservorios intracelulares de *Salmonella*, cuyo papel en las infecciones persistentes aún no ha sido estudiado (Tiérrez y García-del Portillo 2005).

Durante el estado portador, que puede durar muchos años, el organismo excreta continuamente bacterias desde la vesícula biliar al intestino, y desde ahí a las heces, con el consiguiente riesgo de dispersión y contagio. Las anomalías en el conducto biliar o en la vesícula biliar (ej: cálculos biliares) tienen un papel importante en el desarrollo de la infección crónica. De hecho, los individuos con cálculos biliares son más propensos a desarrollar una infección crónica. En la

mayoría de los casos, los antibióticos no son efectivos (Lai *et al.* 1992, Dutta *et al.* 2000), y para eliminar la infección crónica suele ser necesario extirpar la vesícula biliar.

Otros serovares (no tifoideos) de *Salmonella* pueden causar colecistitis persistente o crónica (Lalitha y John 1994). Estas infecciones persistentes sintomáticas también son difíciles de erradicar y suele ser necesaria la extirpación de la vesícula.

Salmonella forma biofilms en la superficie de los cálculos biliares, creando un ambiente de protección frente a las sales biliares, y eventualmente frente a agentes antimicrobianos administrados con fines terapéuticos (Prouty *et al.* 2002).

Serovares como Enteritidis y Typhimurium son responsables de los millones de casos de salmonelosis no tifoidea que se producen anualmente en todo el mundo. Estos serovares, que en humanos causan una gastroenteritis transitoria de gravedad muy variable (pero generalmente autorremittente), también infectan una amplia gama de animales domésticos (ej: aves, ganado vacuno y cerdos) en los que pueden producir diversos tipos de infecciones (desde sistémica a asintomática).

S. enterica serovar Typhimurium es el organismo modelo más utilizado en el estudio de las infecciones de *Salmonella*. Este serovar infecta una gran variedad de hospedadores. En ciertas razas de ratón doméstico, *Mus musculus*, produce una enfermedad similar a la fiebre tifoidea, que sirve como modelo de estudio para las infecciones sistémicas causadas por el serovar Typhi en humanos (**Figura I.1**).

Los ratones BALB/c son particularmente susceptibles a la infección por *Salmonella* porque llevan una mutación en el locus que codifica la proteína Nramp-1, un componente de la resistencia o susceptibilidad innata a infecciones causadas por patógenos intracelulares. La expresión de este locus está restringida a monocitos y es necesaria para controlar la replicación intracelular de microorganismos como *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Leishmania* (Gruenheid *et al.* 1997, Govoni y Gros 1998, Bellamy 1999).

El método clásico para identificar un mutante atenuado en el modelo de ratón es la determinación de su dosis letal media (DL50) comparada con la DL50 de la estirpe silvestre (Reed y Muench 1935). Un procedimiento más sensible y que requiere un menor número de ratones consiste en infectar el mismo ratón con una mezcla de dos estirpes (generalmente una mutante y una silvestre) para obtener un índice de competitividad (IC). Éste se define como la razón entre el número de unidades formadoras de colonia de la estirpe mutante y la silvestre en la salida (órgano diana) dividido por la razón entre ambas estirpes en la entrada (inóculo inicial) (Freter *et al.* 1981, Taylor *et al.* 1987). Este método permite además el estudio de interacciones génicas *in vivo* mediante el uso de infecciones mixtas con mutantes dobles y simples (Beuzón y Holden 2001).

Una limitación del modelo de ratón es que el serovar Typhimurium no produce colitis en este organismo. Por ese motivo, se han desarrollado modelos animales alternativos para el estudio de la gastroenteritis causada por *Salmonella* (Wallis y Galyov 2000). En terneros, la infección oral con los serovares Typhimurium o Dublin desencadena una respuesta similar a la gastroenteritis causada por *Salmonella* en humanos. Recientemente se ha demostrado que los ratones tratados previamente con antibióticos desarrollan inflamación intestinal aguda en respuesta a la infección oral con *S. enterica* serovar Typhimurium (Barthel *et al.* 2003, Coburn *et al.* 2005). Estos estudios han abierto la posibilidad de utilizar el ratón como modelo para el estudio de la salmonelosis [revisado en (Hapfelmeier y Hardt 2005)].

En el ratón, *Salmonella* se multiplica en el tubo digestivo y llega al extremo distal del intestino delgado, el íleon, donde se adhiere preferentemente a las células M del epitelio intestinal (Jones *et al.* 1994). La invasión se produce generalmente en las células M, aunque también se puede producir en enterocitos. Las células M son células epiteliales especializadas, que transportan antígenos intestinales por pinocitosis a las células linfoides situadas bajo el epitelio intestinal, en las placas de Peyer (Brandtzaeg 1989). La invasión de *Salmonella* se ajusta a lo que

técnicamente se denomina “endocitosis mediada por la bacteria”, caracterizada por una profunda reorganización del citoesqueleto de la célula hospedadora hasta formar una estructura membranosa característica, llamada “ruffle”, que engloba a la bacteria en una gran vesícula. Este proceso recuerda a la macropinocitosis inducida por factores de crecimiento, y es morfológica y funcionalmente distinto de la endocitosis mediada por el receptor, que es el mecanismo por el que otros patógenos entran en células no fagocíticas.

En los serovares que producen gastroenteritis, tras la invasión se produce una inducción de la respuesta secretora en el epitelio intestinal y se inicia la migración de neutrófilos hacia el lumen del intestino (Galyov *et al.* 1997). Esta reacción inflamatoria localizada en el sitio de la infección es la principal causa fisiológica de la sintomatología de la gastroenteritis.

Una vez atravesado el epitelio intestinal, los serotipos de *Salmonella* que causan infección sistémica son fagocitados por los macrófagos, y activan los mecanismos de virulencia que les permiten evadir las funciones microbicidas del macrófago. Ello les permite sobrevivir e incluso replicarse dentro de las células fagocíticas. Posteriormente los macrófagos infectados emigran hacia otros órganos del sistema retículo-endotelial, facilitando la diseminación de la bacteria por todo el hospedador (Ohl y Miller 2001).

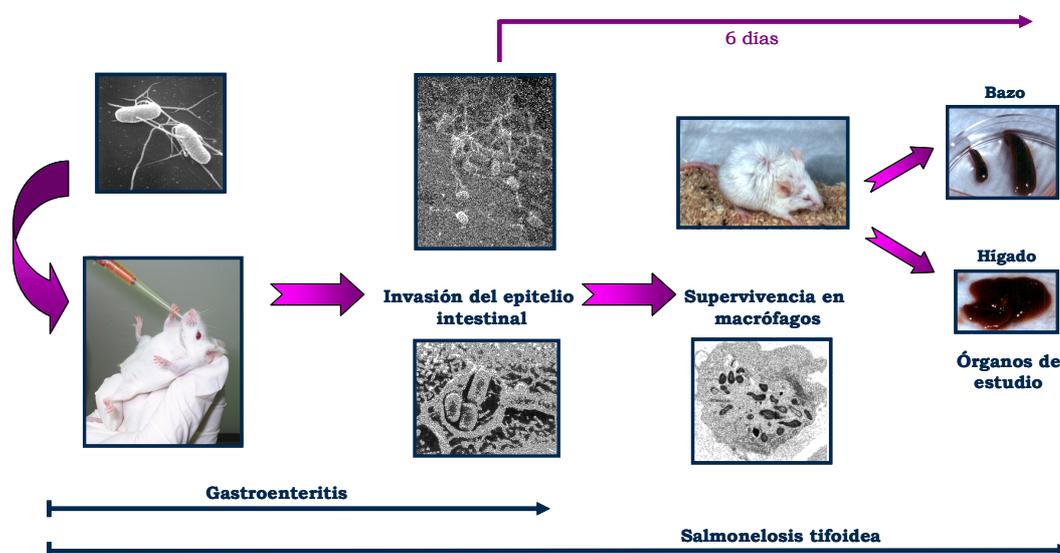


Figura I.1. Modelo animal para el estudio de la patogénesis de *Salmonella*.

Junto a los modelos *in vivo*, se ha utilizado una gran variedad de líneas celulares eucarióticas como modelos *in vitro* para el estudio de la invasión (líneas epiteliales) o de la supervivencia y proliferación intracelulares (líneas fagocíticas y de fibroblastos). El método más usado para estos estudios *in vitro* es el de la protección frente a gentamicina. Este método se basa en la dificultad de la gentamicina para atravesar la membrana celular eucariótica (Elsinghorst 1994). Después de una infección *in vitro*, las bacterias extracelulares se eliminan mediante un tratamiento con gentamicina y las bacterias intracelulares se siembran con las diluciones apropiadas para llevar a cabo recuentos que permitan calcular el porcentaje de invasión con respecto al inóculo inicial. Por otro lado, la tasa de proliferación intracelular se calcula como la razón entre el número de bacterias intracelulares viables presentes tras 24 h de infección y el número de bacterias intracelulares que había justo después del tratamiento con gentamicina (Cano *et al.* 2001). Dada la variabilidad que presentan los resultados de estos experimentos *in vitro*, recientemente se ha propuesto una modificación del método de protección frente a gentamicina que incorpora las ventajas de las infecciones mixtas y permite el cálculo de un índice de competitividad para invasión y para proliferación (Segura *et al.* 2004).

2.2. Factores de virulencia e islas de patogenicidad

En muchos patógenos, los genes de virulencia se encuentran agrupados formando “islas de patogenicidad” (Groisman y Ochman 1996, Hacker y Kaper 2000, Lavigne y Blanc-Potard 2008). Varios indicios sugieren que estas regiones han sido adquiridas por procesos de transferencia horizontal: (a) a menudo tienen un G+C distinto del resto del genoma; (b) se encuentran flanqueadas por genes que están contiguos en especies cercanas evolutivamente pero no patógenas; (c) en algunos casos tienen secuencias en los extremos que presentan homología con elementos de inserción, transposones y profagos, lo que sugiere un posible mecanismo de adquisición (Groisman y Ochman 1996, Hacker y

Kaper 2000). Se han identificado hasta 12 de estas regiones (denominadas SPI-1 a SPI-10, SGI-1 y HGI) en diversos serovares de *S. enterica* (Hensel 2004).

A menudo las islas de patogenicidad contienen genes funcionalmente relacionados. Por ejemplo, la SPI-1 y la SPI-2, que son las islas más grandes y mejor estudiadas, contienen los genes necesarios para la síntesis de sendos sistemas de secreción de tipo III (SST3). Estos sistemas están presentes en muchos patógenos Gram negativos de animales y plantas (Hueck 1998). Los aparatos de secreción de tipo III son estructuras en forma de jeringa que atraviesan las membranas interna y externa de la bacteria. Suelen funcionar cuando la bacteria entra en contacto con la célula hospedadora y secretan proteínas al ambiente extracelular o, con el concurso de proteínas que constituyen el denominado “translocón”, las translocan al interior de la célula eucariótica, donde es frecuente que interfieran con vías de transducción de señales del hospedador en beneficio del patógeno. Las proteínas secretadas por los SST3 y translocadas a las células eucarióticas se denominan efectores. Aunque varios de estos efectores están codificados en SPI-1 o SPI-2, otros están codificados fuera de estas islas, en regiones cromosómicas con características que indican que también se han adquirido por transferencia horizontal. El sistema codificado en la SPI-1 se requiere para iniciar la infección intestinal (Mills *et al.* 1995, Lostroh y Lee 2001, Ehrbar *et al.* 2002), mientras que el codificado en la SPI-2 parece necesario para la infección sistémica (Ochman *et al.* 1996, Shea *et al.* 1996, Waterman y Holden 2003). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el SST3 de la SPI-1 se requiere para la invasión de células M y de células epiteliales en cultivo (Jones *et al.* 1994, Penheiter *et al.* 1997). El SST3 de la SPI-2 es un sistema de virulencia multifuncional que se activa tras la entrada de la bacteria en la célula eucariótica y permite la proliferación bacteriana en todos los tipos celulares probados [revisado en (Kuhle y Hensel 2004)].

Además de las islas de patogenicidad, se pueden encontrar otras regiones más pequeñas, a veces denominadas islotes de patogenicidad,

relacionadas con la virulencia y específicas de *Salmonella* (Groisman y Ochman 1997). También hay genes de patogenicidad asociados a profagos (Figuroa-Bossi *et al.* 2001). Además, algunos miembros del género *Salmonella* portan un plásmido requerido para la infección sistémica, conocido habitualmente como “plásmido de virulencia”. El tamaño de este plásmido varía entre 50 y 90 kb, pero sólo una región de 7.8 kb, llamada *spv* (“*Salmonella* plasmid virulence”), es necesaria para conferir el fenotipo de virulencia en ratones BALB/c (Gulig *et al.* 1993, Rotger y Casadesus 1999).

3. LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

La adaptación a cambios ambientales es esencial para todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos. Los sistemas de transducción de señales funcionan como rutas que enlazan estímulos externos con respuestas adaptativas específicas. A pesar de la gran diversidad de estímulos y respuestas, un número relativamente pequeño de estrategias moleculares se usan para la señalización. La fosforilación de proteínas es una de estas estrategias.

En procariontes, el esquema predominante de señalización está estructurado basándose en dos proteínas conservadas: una proteína histidina-quinasa y un regulador de respuesta, que son fosforilados en una histidina y un aspartato, respectivamente. Son los denominados sistemas de dos componentes (Bourret *et al.* 1989, West y Stock 2001). En todos los casos, las parejas de proteínas comparten la función común de permitir a las células percibir condiciones ambientales y responder ante dichos estímulos. La histidina quinasa es una proteína sensora que, en respuesta a cambios ambientales, se autofosforila en una histidina. Posteriormente transfiere el fosfato al aspártico presente en el regulador de respuesta. Este último suele funcionar como un factor transcripcional, aunque no siempre es así.

Los sistemas de dos componentes son abundantes en la mayoría de las Eubacterias, donde constituyen el 1% de las proteínas codificadas. Se encuentran en muchos contextos funcionales diferentes, y en muchas especies bacterianas. Intervienen en la infección por bacteriófagos, en el transporte de azúcares, en la regulación del flujo de metabolitos, en la virulencia, en la movilidad, y en otros muchos procesos celulares (Cozzone 1988).

Se distinguen de las rutas clásicas de transducción de señales eucarióticas en que en éstas la fosforilación suele ser en una Tyr, una Thr o una Ser. Además, las quinazas de eucariotas no suelen autofosforilarse, sino transferir el fosfato del ATP directamente a su proteína diana. Y por último, en eucariotas se da una amplificación en la cascada de señalización, ya que una quinasa fosforila a muchas dianas, mientras que en procariontes la relación suele ser 1:1 entre quinasa y regulador de respuesta (Robinson *et al.* 2000).

En la **Figura I.2** se puede ver una representación esquemática de un sistema de dos componentes bacteriano.

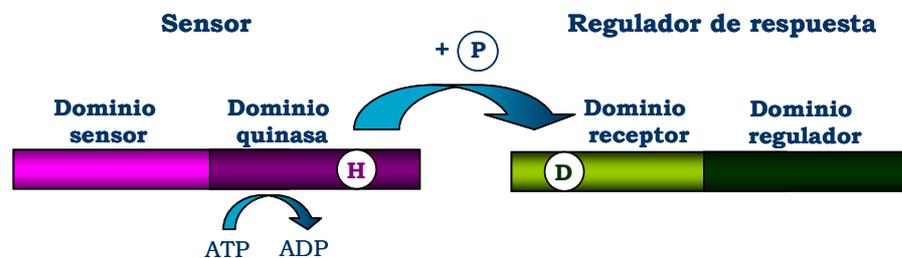


Figura I.2. Esquema general de los sistemas de dos componentes. El sensor, o proteína que detecta cambios en el medio, transfiere un grupo fosfato al regulador de respuesta, que suele ser un factor de transcripción. El sensor se autofosforila en un residuo histidina conservado (H) del dominio quinasa como respuesta a un estímulo detectado por el dominio sensor. El fosfato es transferido a un aspartato conservado (D) en el dominio receptor del regulador de respuesta, cambiando la capacidad del dominio regulador para unirse al ADN.

Existe una variante un poco más compleja de este modelo. En este caso, el fosfato pasa por una cadena de fosforilaciones His-Asp-His-Asp. Este modelo incluye varios pasos de fosfotransferencia, y generalmente más de dos proteínas (West y Stock 2001). Suelen participar quinazas

híbridas, en las cuales los dominios que contienen los residuos His y Asp conservados están presentes en la misma proteína, aunque existen casos en los que ambos dominios están presentes en proteínas diferentes. Esta variante proporciona más versatilidad en las estrategias de señalización y una mayor cantidad de sitios posibles para regulación (**Figura I.3**). Este diseño es más abundante en eucariotas, aunque también se encuentra en procariontes.

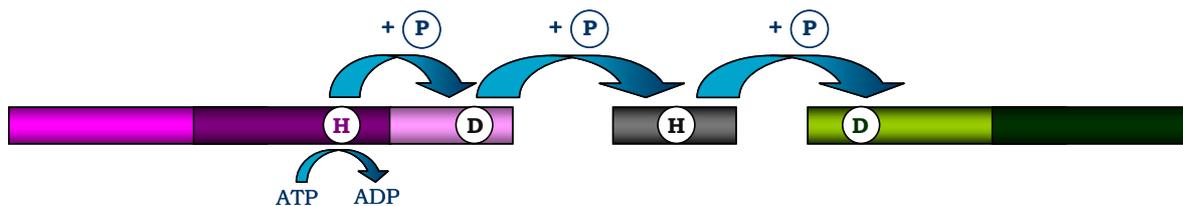


Figura I.3. Esquema de un sistema de dos componentes con más de dos proteínas. La proteína que actúa como sensor tiene ambos residuos susceptibles de fosforilación conservados, una His y un Asp. El grupo fosfato pasa de la His, al Asp, y de ahí a una His de otra proteína intermediaria, una histidina fosfotransferasa. De ésta pasa al regulador de respuesta, concretamente al Asp conservado.

A pesar de su nombre, muy pocos sistemas de dos componentes están formados por sólo dos componentes (West y Stock 2001). Suelen tener otras proteínas auxiliares sobre las que recae la regulación de la ruta. La diana directa o indirecta de todas las estrategias de regulación es el regulador de respuesta, a nivel de la fosforilación, que es lo que determina la respuesta de salida. Muchos reguladores de respuesta tienen una actividad autofosfatasa que limita el tiempo de vida medio del estado fosforilado (Hersh *et al.* 1999). En algunos sistemas existen fosfatasas o proteínas auxiliares que potencian la actividad fosfatasa del regulador de respuesta, con lo que se acelera la desfosforilación. Además, muchas proteínas sensoras tienen actividad fosfatasa (Keener y Kustu 1988, Aiba *et al.* 1989, Lois *et al.* 1993).

3.1. Las proteínas sensoras

Las proteínas que actúan percibiendo los cambios ambientales, o proteínas sensoras, comparten una homología de secuencia de unos 200 aminoácidos en el extremo C-terminal (Nixon *et al.* 1986, Ronson *et al.* 1987). Muchos miembros de esta familia son proteínas transmembrana, suelen ser homodímeros, y se ha propuesto que tienen un dominio N-terminal, periplásmico, que detecta cambios en el ambiente, y un dominio C-terminal, citoplasmático, que transduce la señal. Aún así, existen proteínas de esta familia que están localizadas en el citoplasma bacteriano y detectan señales intracelulares, como CheA y NtrB (Stock *et al.* 2000, Khorchid y Ikura 2006).

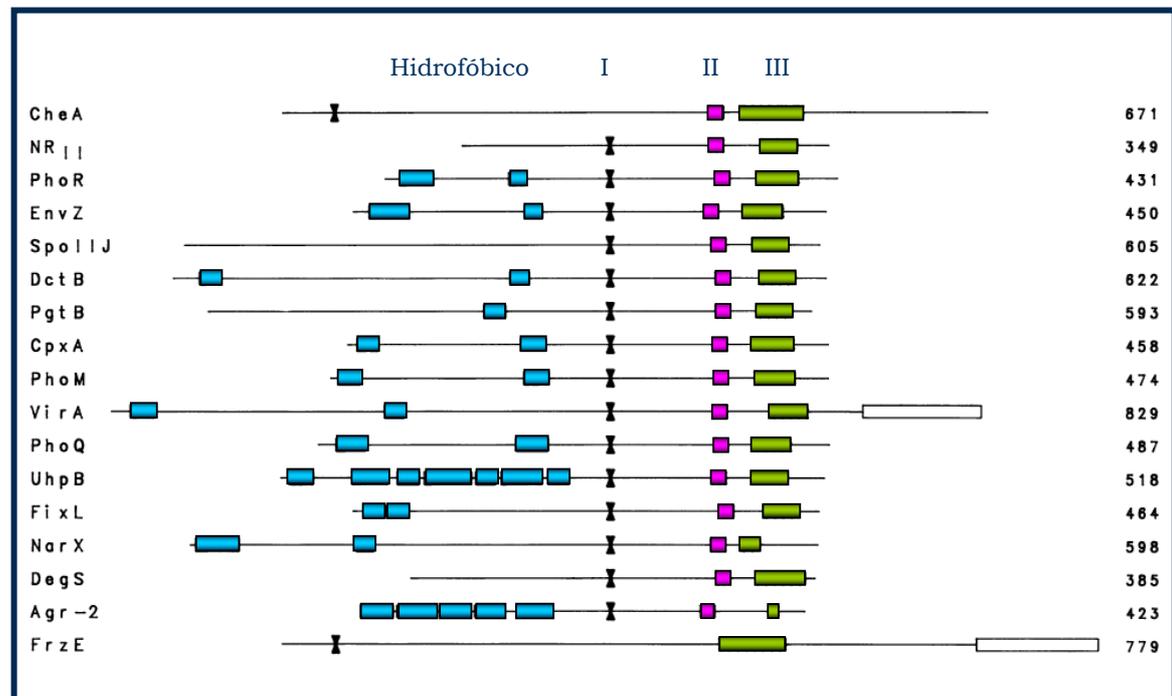


Figura I.4. Organización de los dominios en las histidina-quinasas. Los recuadros azules corresponden a las secuencias transmembrana hidrofóbicas. La región I contiene la His conservada, representada por una X; la región II está indicada por el recuadro morado, y contiene una Asn conservada; la secuencia rica en Gly de la región III se representa por un recuadro verde. Los recuadros blancos son homólogos de los dominios de regulación de reguladores de respuesta. Los números designan el número total de aminoácidos (Stock *et al.* 1989).

Además de la His conservada, poseen un residuo Asn, también conservado, en la región II, y una secuencia rica en Gly, en la región III (**Figura I.4**). El resto de las regiones dentro de las quinasas suele ser muy variable (Stock *et al.* 1989).

La detección de la señal específica por la proteína correspondiente causa su activación, y como resultado se produce la hidrólisis del ATP y la autofosforilación de la His conservada en el subdominio de fosfotransferencia (Hoch 2000). Este dominio interacciona con un dominio regulador de una proteína reguladora de respuesta. La autofosforilación es una reacción bimolecular que tiene lugar en un homodímero, en la cual un monómero de la histidina quinasa cataliza la fosforilación de la His conservada del otro monómero (Wolfe y Stewart 1993). El dominio de dimerización está cerca de la His conservada.

Las estructuras estudiadas de las proteínas que actúan como sensores del medio indican que se trata de una clase estructural nueva de quinasas, distintas de las Ser/Thr o Tyr-quinasas de eucariotas. Sin embargo, están relacionadas con un pequeño grupo de proteínas de unión a ATP formado por la girasa B (Wigley *et al.* 1991), la chaperona Hsp-90 (Prodromou *et al.* 1997) y la enzima de reparación de emparejamientos erróneos MutL (Ban y Yang 1998). De forma colectiva, este grupo de proteínas con dominios ATP-asa de funcionalidad divergente representa una clase distinta de proteínas de unión a ATP llamada la superfamilia GHKL (Dutta *et al.* 2000). Comparten el núcleo estructural común y los motivos de secuencias conservadas que forman el bolsillo de unión a ATP.

3.2. Los reguladores de respuesta

Para cada proteína de la familia anterior existe una proteína reguladora correspondiente (Nixon *et al.* 1986, Ronson *et al.* 1987), [revisado en (Stock *et al.* 2000, West y Stock 2001)]. Las proteínas de esta clase comparten similitud de secuencia de unos 120 aminoácidos en el extremo N-terminal. En los casos de las proteínas CheY y SpoOF, que

son muy pequeñas, la secuencia conservada comprende la proteína entera. Son estructural y funcionalmente análogos a los miembros de la familia Ras de eucariotas.

Las proteínas que actúan como reguladores de respuesta tienen dos (o más) dominios claramente diferenciados (West y Stock 2001).

El dominio regulador está en el extremo N-terminal, y tiene tres actividades. La primera es interactuar con las quinasas fosforiladas y catalizar la transferencia del grupo fosfato a su propio residuo Asp. La segunda es catalizar la auto-desfosforilación. Y la tercera es regular la actividad de su dominio efector asociado en una manera dependiente de fosforilación. La actividad autofosfatasa difiere mucho entre distintos reguladores, por lo que la vida media del Asp fosforilado varía entre segundos y horas, es decir, cubre un rango de cuatro órdenes de magnitud. El tiempo de vida medio de la forma activa de distintos reguladores de respuesta parece correlacionar bien con su función fisiológica y otras estrategias de regulación del sistema.

Los dominios efectores de los reguladores de respuesta están en el dominio C-terminal de la proteína. Son diversos en cuanto a estructura y función, por eso no sorprende que existan muchos mecanismos diferentes para la regulación de su actividad por parte de los dominios de regulación de los reguladores de respuesta.

La mayoría de los reguladores de respuesta actúan como factores de transcripción, con dominios efectores de unión al ADN. Sin embargo, algunos reguladores de respuesta presentan un dominio C-terminal que tiene actividad enzimática, como es el caso de CheB (Stock *et al.* 2000).

La determinación de la estructura de cuatro reguladores de respuesta fosforilados, o activados de alguna otra forma (Birck *et al.* 1999, Kern *et al.* 1999, Halkides *et al.* 2000, Lee *et al.* 2001) ha confirmado la hipótesis de que la fosforilación del regulador de respuesta en el Asp del sitio activo está asociada con una conformación alterada del dominio regulador. Parece existir un mecanismo común en los cambios estructurales que se propagan desde el sitio activo.

4. EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

En especies bacterianas con varias decenas de sistemas de dos componentes como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, está claro que la mayoría de los sistemas fueron apareciendo por duplicación génica de uno o más sistemas ancestrales, y evolucionaron para adquirir nuevas señales de entrada y nuevas especificidades de promotores diana de salida (Hoch 2000). Por ejemplo, en *B. subtilis*, es posible identificar familias de sistemas de dos componentes derivados de un único sistema basándose en la conservación de las secuencias situadas alrededor de la His fosforilable de la proteína sensora, los residuos aminoacídicos del sitio activo del regulador de respuesta, la estructura del dominio de salida del regulador y el orden relativo dentro del cromosoma de los genes que codifican la quinasa y el regulador de respuesta (Fabret *et al.* 1999). Sin embargo, los dominios sensores de las histidinas quinasas difieren mucho entre sí en tamaño y estructura, incluso dentro de una misma familia. Aunque muchos de estos dominios están localizados en la membrana, el número de regiones transmembrana varía mucho (Hoch 2000). Incluso existen quinasas parálogas estrechamente relacionadas que muestran poca similitud de secuencia de aminoácidos en la porción periplásmica. Probablemente, la variabilidad global de los dominios sensores es debida a la gran diversidad de moléculas de señalización detectadas por el organismo. Pero es posible que la hipervariabilidad particular que presentan las porciones periplásmicas de estos dominios se deba a que se trate de secuencias ancestrales sin función enzimática ni estructural.

5. ESPECIFICIDAD ENTRE LA QUINASA Y EL REGULADOR DE RESPUESTA

La gran cantidad de parejas de quinasas y reguladores de respuesta presentes en las bacterias, junto con la conservación estructural de los reguladores de respuesta y del dominio de fosfotransferencia de las quinasas, nos lleva a la cuestión de cómo las células activan los genes precisos ante una determinada señal. Debe existir una especificidad muy alta entre la quinasa y su regulador de respuesta para excluir la posibilidad de que otro regulador secuestre el grupo fosfato y active genes inapropiados (Bijlsma y Groisman 2003). Cabe también la posibilidad de que, en ciertas circunstancias, pueda ser interesante la activación cruzada entre sistemas de dos componentes con objeto de integrar diferentes señales o de producir varias respuestas ante una señal (Laub y Goulian 2007).

Las interacciones proteína-proteína normalmente ocurren entre grandes superficies y suelen ser multifactoriales, es decir, suelen ser el resultado de muchas interacciones débiles. Se ha propuesto que los residuos conservados de las quinasas funcionan como anclaje y que median la interacción con residuos conservados alrededor del Asp conservado en el regulador de respuesta, lo que lleva a que los residuos catalíticos de ambas moléculas queden muy próximos (Tzeng y Hoch 1997, Zapf *et al.* 2000). Por tanto, la especificidad entre una pareja de proteína sensora/regulador de respuesta debe estar mediada por otros residuos hipervariables alrededor del Asp, que interactúan con los residuos cercanos a la His fosforilable de las quinasas (Zapf *et al.* 2000, Hoch y Varughese 2001). Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios de mutagénesis. Por consiguiente, estos dos grupos de secuencias son las responsables de la especificidad de respuesta (Fabret *et al.* 1999). Se podrían definir por tanto tres clases de aminoácidos dentro de estas proteínas: aminoácidos invariables, que forman el dominio catalítico; aminoácidos de anclaje, que posicionan las proteínas en la orientación correcta; y aminoácidos de reconocimiento, muy variables, que previenen

la interacción heteróloga de parejas de proteínas no canónicas, asegurando la fidelidad en la propagación de la señal (Hoch y Varughese 2001).

La fosforilación cruzada (o “cross-talk”) entre una quinasa y un regulador de respuesta de dos sistemas diferentes se puede observar *in vitro*. Sin embargo, la tasa de transferencia de fosfato en estos casos es siempre menor que entre las parejas canónicas. Los determinantes de reconocimiento en ambas proteínas son importantes para formar el complejo productivo que promueve la fosfotransferencia (West y Stock 2001). En ensayos *in vivo* sólo se observa este tipo de fosforilación cuando la proteína sensora no relacionada está sobreexpresada o cuando el gen que codifica la proteína propia está deletado. Además, los niveles de fosforilación cruzada observados son demasiado bajos para que ocurra cuando estas proteínas se encuentran a niveles normales de expresión (Bijlsma y Groisman 2003).

Hay bastantes pruebas de que muchos reguladores de respuesta pueden recibir el fosfato a partir de una pequeña molécula donadora de fosfatos denominada acetil fosfato [revisado en (Wolfe 2005)]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los efectos del acetil fosfato se han puesto de manifiesto en ausencia de la correspondiente histidina quinasa, por lo que se desconoce la importancia fisiológica de estas fosforilaciones.

Hay dos factores que parecen ser especialmente importantes en el mantenimiento de un nivel bajo de fosforilación cruzada. Uno es la competencia entre reguladores de respuesta: aunque una histidina quinasa pueda interactuar con varios reguladores no específicos, tiene una afinidad mucho mayor por el de su propio sistema. El otro factor es la actividad fosfatasa que tienen muchas histidina quinasas, que se encarga de eliminar cualquier fosforilación inapropiada de su regulador de respuesta realizada por otra histidina quinasa o por el acetil fosfato (Laub y Goulian 2007).

Hay quinasas que no parecen estar acopladas a un único regulador de respuesta, como por ejemplo CheA, que fosforila tanto a CheY como a

CheB. Las características de las proteínas que determinan la especificidad de la interacción entre una quinasa y su regulador de respuesta son probablemente bastante sutiles. CheY y CheB aceptan el grupo fosfato de CheA con la misma cinética aproximadamente, a pesar de que tienen menor similitud que otras parejas de reguladores elegidos al azar dentro de la familia. Cuando se comparan las tasas de transferencia de fosfato desde la quinasa CheA hacia su regulador de respuesta, CheY, con las tasas de transferencias hacia otros reguladores de respuesta, se observa que difieren menos de 100 veces. Sin embargo, experimentalmente es posible obtener diferencias mucho mayores en afinidad mediante sustituciones de un solo aminoácido. ¿Por qué, pues, la evolución no ha llevado a selectividades mucho mayores de las quinasas por sus respectivos reguladores? Caben dos respuestas contrapuestas, desde la perspectiva adaptacionista: (1) la fosforilación cruzada que se observa *in vitro* es suficientemente importante para haberse seleccionado, (2) la fosforilación cruzada es irrelevante y no es necesario seguir seleccionando mayores diferencias de afinidad (Stock *et al.* 1989).

Además, diferentes señales pueden converger en la misma ruta de regulación si el estado fosforilado de un regulador de respuesta se modifica por varios sensores relacionados, cada uno en respuesta a una señal diferente.

Se han encontrado ejemplos de interacción entre diferentes sistemas de dos componentes a través de proteínas que no forman parte de estos sistemas. Uno de ellos es la conexión entre los sistemas PmrAB y PhoPQ a través de la proteína PmrD (Kato y Groisman 2004). Estas interacciones posibilitan a un sistema responder a múltiples señales, lo cual es importante para que las bacterias puedan responder minuciosamente a cambios ambientales complejos. Un esquema de esta respuesta se representa en la **Figura I.5**.

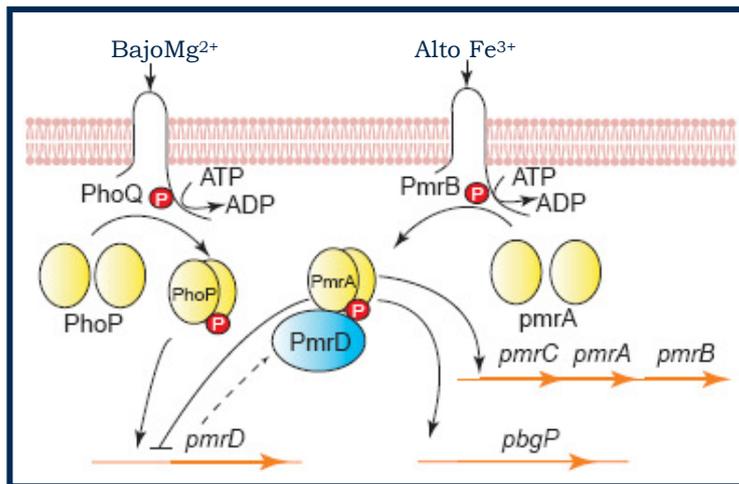


Figura I.5. Esquema de la conexión entre dos sistemas de dos componentes. La proteína PmrD conecta los sistemas PhoPQ y PmrAB. La expresión de PmrD es activada por el sistema PhoPQ. PmrD se une a la forma fosforilada de PmrA, previniendo su desfosforilación, y por tanto activando el sistema PmrAB. Figura adaptada de Eguchi y Utsumi (Eguchi y Utsumi 2005).

6. LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES Y LA VIRULENCIA

Muchas bacterias patógenas encuentran diferentes microambientes durante la infección, y la capacidad de adaptarse a distintos nichos dentro y fuera del hospedador, con frecuencia, está mediada por sistemas de dos componentes (Beier y Gross 2006). Debido a su versatilidad para detectar señales intracelulares y extracelulares, y a su variable arquitectura modular, los sistemas de dos componentes son mecanismos apropiados para la regulación de la virulencia. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el fenotipo de avirulencia de muchos mutantes en los sistemas de dos componentes se debe, en ocasiones, a interferencias con requerimientos metabólicos de las células, más que a cambios en la expresión de factores específicos de virulencia.

A pesar del conocimiento detallado del mecanismo de transducción de señales basado en fosforilación, existe poca información sobre las bases moleculares de su contribución a la virulencia de la mayoría de los patógenos. No se conoce la naturaleza de las señales relevantes para la

infección, ni sus mecanismos de percepción, ni las dianas de la regulación mediada por sistemas de dos componentes, ni las redes de regulación en las que están integrados para controlar la expresión de fenotipos tan diversos. Los estudios futuros deben centrarse en investigar estas características, debido a que la ausencia de sistemas de dos componentes en mamíferos los convierte en buenas dianas para el desarrollo de terapias antibacterianas. Sin embargo, hay algunos estudios de mecanismos de regulación de la virulencia por sistemas de dos componentes.

6.1. Regulación de la virulencia en *Salmonella enterica*

Muchos de los fenotipos de virulencia de *S. enterica* se pueden atribuir a la presencia de las islas de patogenicidad (SPIs). Como se mencionó antes, las islas 1 y 2 codifican sistemas de secreción tipo III, que confieren a *Salmonella* la habilidad de invadir activamente células no fagocíticas y de replicarse dentro del fagosoma (Galán y Zhou 2000, Waterman y Holden 2003). Los fenotipos de virulencia están controlados por una compleja interacción de reguladores transcripcionales, que implica una sofisticada red de intercomunicación entre sistemas de dos componentes.

El sistema **PhoPQ** es el principal regulador de la virulencia de *Salmonella*. Tanto su inactivación (por mutaciones nulas en *phoP* o *phoQ*) como su hiperactivación (por una mutación de ganancia de función en *phoQ*, el gen para la histidina quinasa) conllevan atenuación de la virulencia en ratones (Fields *et al.* 1986, Galán y Curtiss 1989, Miller *et al.* 1989, Miller y Mekalanos 1990). Otros fenotipos del mutante nulo son la incapacidad de sobrevivir dentro de macrófagos y la susceptibilidad a péptidos antimicrobianos (Groisman 2001). La señal que detecta PhoQ es la concentración periplásmica de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , y debido a que la concentración iónica en el fagosoma es baja, se considera que el Mg^{2+} es el principal indicio ambiental para informar a *Salmonella* de que se encuentra en el interior de la vacuola fagocítica. El modelo actualmente

más aceptado sugiere que *Salmonella* identifica el ambiente en que se encuentra dentro del hospedador midiendo los niveles de Mg^{2+} a través de la proteína PhoQ (Groisman 2001). Una concentración baja de Mg^{2+} es propia del ambiente intracelular y lleva a la activación del sistema PhoPQ. Por otro lado, una concentración alta de Mg^{2+} es indicativa del ambiente extracelular y lleva a la inactivación del sistema. En consecuencia, los genes activados por PhoP (genes *pag*) se expresan dentro de las células hospedadoras, mientras que los genes reprimidos por PhoP (genes *prg*) se expresan fuera de las células hospedadoras. El regulón PhoPQ comprende más de 40 genes, que se pueden clasificar como ancestrales (o presentes en otras enterobacterias) o específicos de *Salmonella*, que se supone fueron incorporados al cromosoma de *Salmonella* por transferencia horizontal. Los ancestrales están relacionados con la toma de Mg^{2+} , y con la reducción de la necesidad de Mg^{2+} de la envuelta celular.

El gen *pmrD* codifica la proteína PmrD, y pertenece a los genes ancestrales del regulón PhoPQ. Como se vio anteriormente en la **Figura I.5**, esta proteína media la regulación del regulón PmrAB dependiente de PhoP y Mg^{2+} (Kox *et al.* 2000).

El sistema **PmrAB** controla genes involucrados en la resistencia a polimixina B modificando la carga neta del lipopolisacárido (Gunn *et al.* 2000). Se activa directamente por la unión de iones Fe^{3+} al dominio periplásmico de PmrB. Esto lleva a la inhibición de la actividad fosfatasa de PmrA sobre PmrB. La activación del sistema PmrAB por Mg^{2+} es el resultado de una interacción específica de PmrD con el extremo N-terminal de PmrA, que lo protege de la desfosforilación por parte de su quinasa (Kato y Groisman 2004).

Los miembros del regulón PhoPQ específicos de *Salmonella* están implicados en virulencia y supervivencia dentro de los macrófagos. Algunos de estos genes están regulados por PhoP y SlyA, que es un regulador transcripcional de la familia MarA (Shi *et al.* 2004, Navarre *et al.* 2005). Se ha publicado un control transcripcional positivo del gen

slyA por PhoP, sin embargo distintos estudios han dado resultados contradictorios. Se ha observado una relación directa entre el sistema PhoPQ y la supervivencia en macrófagos (Bijlsma y Groisman 2005), ya que la expresión del sistema de dos componentes **SsrAB**, que regula la transcripción de los genes de la isla de patogenicidad 2, tanto de los que codifican componentes estructurales del aparato de secreción tipo III como de los que especifican proteínas efectoras, está controlada por PhoPQ. El control de la transcripción de *ssrB* se produce por unión directa de PhoP al promotor de *ssrB*, mientras que la expresión de SsrA está modulada por PhoP a nivel postranscripcional, un efecto que es dependiente de la región 5' no traducida del transcrito de *ssrA* (Bijlsma y Groisman 2005). La transcripción de *ssrA* y *ssrB* dentro de los macrófagos también requiere el sistema de dos componentes **OmpR-EnvZ**, por unión directa de OmpR fosforilado en las regiones corriente arriba de los genes *ssrA* y *ssrB* (Feng *et al.* 2003). Además, SsrB fosforilado se ha visto que se une a regiones localizadas corriente abajo de los sitios de inicio de la transcripción de *ssrA* y *ssrB*, solapando con los sitios de unión de OmpR, lo que sugiere una autorregulación de este regulador de respuesta (Feng *et al.* 2004). A partir de estas observaciones, Bijlsma y Groisman (Bijlsma y Groisman 2005) desarrollaron la hipótesis de que OmpR-EnvZ promueve la transcripción de *ssrB* poco tiempo después de la internalización de *Salmonella* por los macrófagos, mientras que en etapas más tardías de la infección, cuando las condiciones dentro de la vacuola han cambiado, la actividad de OmpR-EnvZ podría disminuir, y el sistema PhoP-PhoQ podría ser el responsable de la síntesis de las proteínas SsrB y SsrA.

Además de regular la expresión de los genes de la isla 2 de patogenicidad, PhoP está implicado en la represión de los genes de invasión, presentes en la isla 1, regulando negativamente el gen *hilA* (Bajaj *et al.* 1996). El sistema de dos componentes **BarA-SirA** también controla la expresión de los genes de invasión. El efecto regulador de este sistema está mediado principalmente por el sistema CsrAB, a través de la regulación del regulador transcripcional tipo AraC, HilD (Ellermeier *et al.*

2005), que junto con HilC y RtsA, controla la transcripción de *hilA*. La proteína CsrA, cuya actividad está controlada por la interacción con los ARN reguladores CsrB y CsrC, afecta a la expresión de HilD e HilC (Altier *et al.* 2000), y a su vez SirA induce la transcripción del ARN regulador CsrB (Lawhon *et al.* 2002). Además, se ha observado unión directa de SirA a las regiones corriente arriba de *hilA* e *hilC* (Teplitski *et al.* 2003). Por otro lado, mutaciones en los genes *ompR* o *envZ* reducen la expresión de *hilA* (Lucas y Lee 2001), y se ha sugerido que OmpR-EnvZ controla los genes de invasión induciendo la transcripción de *hilA* a través de HilD. Recientemente se ha propuesto un modelo según el cual la presencia de sal o de sacarosa en el medio (estímulos que se sabe que inducen la expresión de los genes de invasión) provoca la autofosforilación de la quinasa BarA. Ésta cede su fosfato al regulador de respuesta SirA. SirA fosforilado activaría entonces a un factor transcripcional desconocido, distinto de los ARN pequeños Csr. Ese factor activaría la transcripción de *hilD*, cuyo producto a su vez activa a *hilA*. En este modelo el papel del sistema OmpR-EnvZ sería secundario (Mizusaki *et al.* 2008).

En resumen, existen al menos 5 sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la virulencia de *Salmonella*: PhoPQ, PmrAB, OmpR-EnvZ, SsrAB y SirA-BarA, y se han demostrado interacciones entre algunos de ellos.

Un esquema de toda esta red de regulación se presenta en la **Figura I.6.**

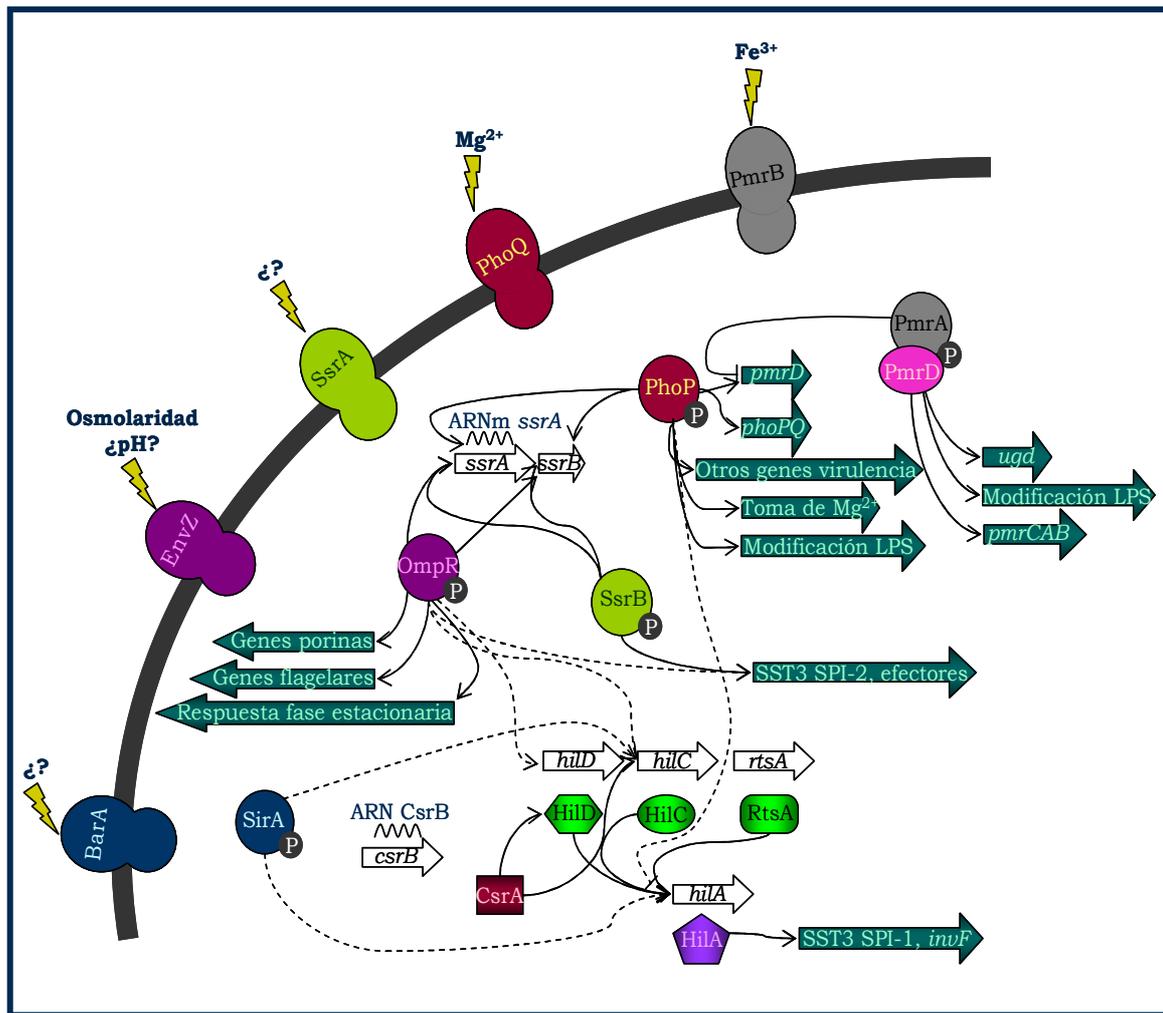


Figura I.6. Representación esquemática de la red de regulación que controla la expresión de los genes de virulencia de *S. enterica*. La línea gris representa la membrana citoplasmática con las diferentes histidina-quinasas. Los reguladores de respuesta se representan en el mismo color que sus quinasas correspondientes. P indica fosforilación. Las líneas discontinuas representan interacciones con resultados contradictorios publicados. Figura adaptada de Beier y Gross (Beier y Gross 2006).

7. EL SISTEMA Rcs

El sistema Rcs se identificó por su papel en la regulación de la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de la cápsula de ácido colánico en *E. coli* (Brill *et al.* 1988, Stout y Gottesman 1990). Más que un sistema de dos componentes se ha visto que es un sistema de fosforilaciones con varios componentes. Este sistema es único entre los

reguladores de dos componentes en *Escherichia coli*, ya que está compuesto por tres proteínas y cuatro dominios de señalización. Además, el regulador de respuesta puede actuar solo o en asociación con otros reguladores auxiliares. Este sistema parece ser exclusivo de la familia *Enterobacteriaceae*, pero los genes *rsc* no están presentes en ninguna de las enterobacterias endosimbióticas con genoma pequeño, como *Buchnera* o *Wigglesworthia* (Huang *et al.* 2006). Se encuentra en muchas bacterias patógenas, como *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*, patógenos de plantas como *Erwinia carotovora* y *Pantoea stewartii*, y en *Proteus mirabilis*. Se piensa que tanto el mecanismo básico de acción como las funciones del sistema están conservados en estos organismos (Majdalani y Gottesman 2005). En los organismos donde la información genética está disponible, los genes *rscC*, *rscD* y *rscB* están juntos y tienen una organización génica conservada (**Figura I.7**).

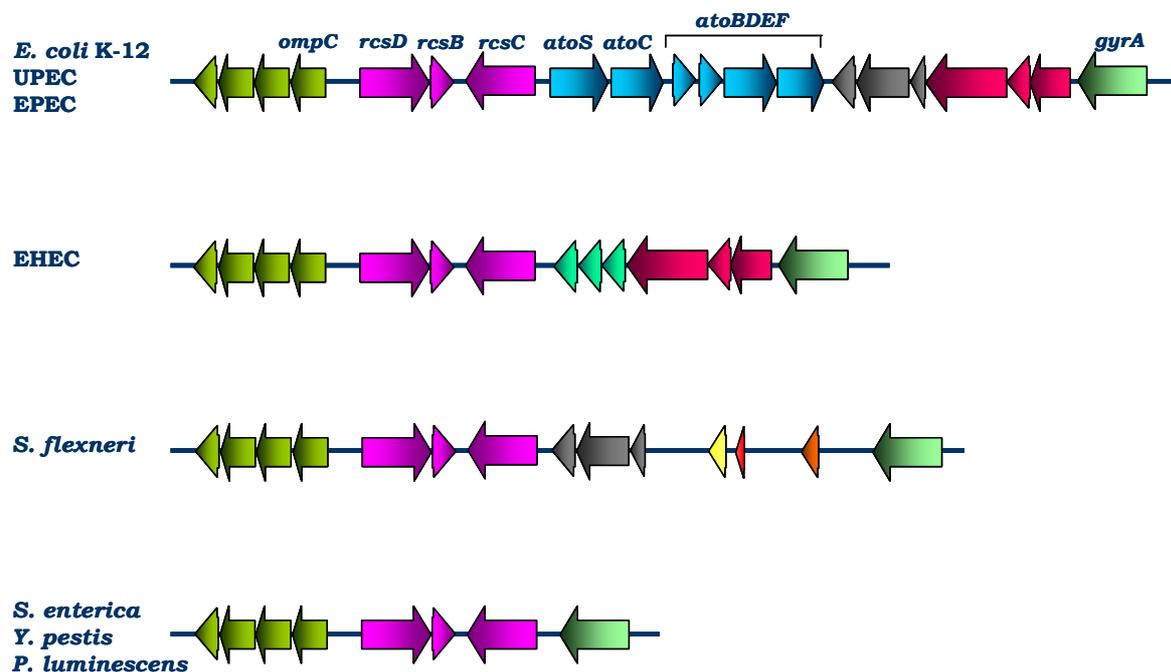


Figura I.7. Análisis comparativo del locus *rsc* en la familia *Enterobacteriaceae*. Las estirpes comparadas son *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* CFT073 (UPEC), *E. coli* E2348/69 (EPEC), *Shigella flexneri* 2a 2457T, *S. enterica* serovar Typhimurium LT2, *Y. pestis* KIM y *P. luminescens* TT01. Los genes que codifican proteínas homólogas en los distintos genomas están representados en el mismo color. Figura adaptada de Huang y colaboradores (Huang *et al.* 2006).

7.1. Miembros del sistema Rcs

a) RcsC

RcsC es la proteína que detecta los estímulos externos. Es una proteína de membrana interna, con un dominio periplásmico importante (Stout y Gottesman 1990). La mayor parte de la proteína es citoplásmica, e incluye, además del dominio sensor quinasa clásico (H1), un dominio adicional que se parece a los dominios receptores de los reguladores de respuesta (D1). Este dominio podría representar un dominio amortiguador de la señal, en el cual el fosfato se transfiere al Asp de este dominio de RcsC en lugar de a RcsB, o podría ser un paso más en la compleja ruta de transmisión de la señal. Con la identificación de la proteína RcsD, antes llamada YojN, se ha podido entender que la señal viaja desde el dominio H1 de RcsC hasta el D1 de la misma proteína, y de aquí a la His conservada de RcsD, desde donde pasaría al Asp conservado de RcsB. En la **Figura I.8** se puede ver una representación esquemática de RcsC.



Figura I.8. Organización de los dominios de la proteína RcsC. El dominio PAS no está anotado en todas las bases de datos. TM1 y TM2 representan los dominios transmembrana. H1 es el dominio his-quinasa, y D1 el dominio receptor.

Existen indicios de que RcsC y RcsD intervienen tanto en la fosforilación como en la desfosforilación de RcsB. Esta idea se basa en la expresión de un gen activado por RcsB de manera independiente de RcsA, el gen *rprA*. Este gen no se expresa en la estirpe silvestre, pero sí lo hace en mutantes nulos *rscC* o *rscD* (Majdalani *et al.* 2002, Majdalani *et al.* 2005). Esto sugiere que RcsC, al igual que muchas otras histidina quinasa, posee una actividad fosfatasa, y que la pérdida de esta actividad o de la proteína intermediaria en la fosforilación (RcsD),

impiden la eliminación de fosfato de RcsB, que, por otro lado, podría recibir una fosforilación cruzada desde fuentes desconocidas.

b) RcsD

RcsD es la proteína que sirve de intermediario en la ruta de fosforilación entre RcsC y RcsB. Presenta similitud de secuencia con RcsC, especialmente en el dominio histidina quinasa. Sin embargo, este dominio podría no ser funcional ya que le falta la His autofosforilable. Además, a diferencia de RcsC, RcsD no contiene un dominio receptor en su porción carboxilo, sino que posee un dominio HPT (histidina fosfotransferasa) de unos 100 aminoácidos (Takeda *et al.* 2001, Rogov *et al.* 2004). Se asume que RcsC y RcsD actúan como un heterodímero que controla el estado de fosforilación del regulador global RcsB. El dominio HPT juega un papel fundamental en la transferencia de la señal, ya que media específicamente la transferencia del fosfato entre los dos dominios receptores de RcsB y RcsC. Esta reacción puede ser reversible. En la **Figura I.9** se representa la estructura de esta proteína.



Figura I.9. Organización de los dominios de la proteína RcsD. H2 representa el dominio HPT de esta proteína. No está claro que los dominios de entrada de las proteínas RcsC y RcsD sean homólogos.

c) RcsB

El dominio N-terminal de *rcsB* es el típico de la familia de reguladores de respuesta. El dominio C-terminal, el de unión al ADN, coloca a esta proteína en la familia de LuxR (Stout y Gottesman 1990). RcsB fosforilado cambia su conformación, y esto le permite unirse a las secuencias promotoras de determinados genes dianas para activar o reprimir dichos genes. Se puede observar un esquema de esta proteína en la **Figura I.10**.

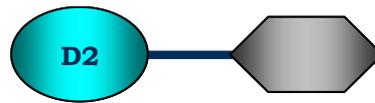


Figura I.10. Organización de la proteína RcsB. D2 representa el dominio receptor. El otro dominio es el de unión al ADN, y pertenece a la familia LuxR.

El sistema de señalización funciona de la forma siguiente: RcsC detecta un estímulo ambiental, lo que provoca que la His del dominio H1 sea fosforilada mediante una reacción de autofosforilación. El grupo fosfato es transferido al Asp conservado del dominio D1 de RcsC. Desde ahí, el fosfato viaja al residuo His del dominio HPt de RcsD, y finalmente pasa al dominio D2 de RcsB. Una vez fosforilado, RcsB se activa y es capaz de unirse al ADN y regular la transcripción de sus genes diana.

Los datos de Mariscotti y colaboradores (Mariscotti y García-Del Portillo 2008) sugieren que, bajo condiciones constantes, el sistema Rcs de *Salmonella enterica* podría tener un exceso de proteínas sensora y fosfotransmisora, lo que aseguraría una rápida respuesta cuando se encuentra con el estímulo. Esta configuración sería esencialmente regulada a nivel de la transferencia de fosfato, lo que explicaría los niveles constantes de RcsC, RcsD y RcsB observados en la estirpe silvestre y el mutante *igaA1* (que tiene activado el sistema Rcs) (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Este modelo también explicaría por qué hacen falta represores específicos para afinar la respuesta de salida en condiciones basales y de inducción.

7.2. Proteínas auxiliares del sistema Rcs e interacción con otros sistemas

La ventaja de tener un regulador como RcsB que requiere proteínas auxiliares, y que puede actuar con muchas proteínas correguladoras diferentes, es que permite múltiples entradas de regulación distintas, proporcionando un mecanismo sencillo para la regulación de un

conjunto de genes regulados por RcsB. Las señales que afectan a la síntesis o actividad de los corre reguladores sólo afectan a la síntesis de aquellas dianas que son dependientes del corre regulador.

a) RcsA

Es la proteína auxiliar del sistema Rcs más estudiada. Como se verá más adelante, coopera con RcsB en la activación de los genes necesarios para la síntesis de la cápsula de ácido colánico (*wca*). Como en el caso de RcsB, el dominio C-terminal de RcsA contiene un motivo de unión al ADN, que pertenece a la familia LuxR/FixJ. El dominio N-terminal está relacionado con los reguladores de respuesta, pero le falta el Asp conservado, que es el sitio habitual de fosforilación, así como otros residuos característicos (Stout *et al.* 1991). Es una proteína de vida corta, sujeta a la degradación por la proteasa Lon, y en menor medida por la proteasa ClpYQ (Trisler y Gottesman 1984, Torres-Cabassa y Gottesman 1987, Kuo *et al.* 2004). En *Klebsiella pneumoniae* existe una proteína implicada en la síntesis de la cápsula K2 junto con RcsB, llamada RmpA, que podría ser un homólogo de RcsA (Nassif *et al.* 1989).

b) TviA

En *Salmonella typhi*, el antígeno Vi asociado a virulencia se sintetiza en un proceso dependiente de RcsB e independiente de RcsA. En cambio, la proteína TviA, codificada en el agrupamiento de genes Vi, es necesaria para la activación (Virlogeux *et al.* 1996). TviA no está relacionada con RcsA ni con otras proteínas de la familia LuxR. Aunque no se ha demostrado que se una al ADN, su capacidad de suprimir una mutación sin sentido en *rscB* en el dominio de unión al ADN puede sugerir que interacciona con RcsB y estimula su capacidad de unión al ADN (Brill *et al.* 1988).

c) PhoP

Este caso es un ejemplo de cooperación entre RcsB y otro regulador de respuesta. En *S. typhimurium*, la expresión del gen *ugd* es activada desde un promotor dependiente y otro independiente de RcsB, reflejando la variedad de funciones de esta enzima (Mouslim y Groisman 2003). RcsA coopera con RcsB para estimular la síntesis bajo ciertas condiciones ambientales. Sin embargo, bajo otras condiciones (alto Fe^{3+} y bajo Mg^{2+}), PhoP actúa en lugar de RcsA (Mouslim *et al.* 2003). La escasez de Mg^{2+} conduce a la activación de PhoP, y su sitio de unión está a más de 70 nucleótidos corriente arriba del sitio de unión de RcsB. Este resultado sugiere la posibilidad de que RcsB sea capaz de cooperar con otros reguladores mucho más ampliamente de lo que se sospechaba.

7.3. Modo de acción de RcsB

RcsB actúa según dos mecanismos generales para la activación o represión de sus promotores diana.

a) Dependiente de RcsA

Este caso está ejemplificado por la regulación de los genes *wca* en *E. coli* y genes relacionados con la cápsula en los patógenos de plantas *Erwinia amylovora* y *Pantoea stewartii*. Experimentos genéticos sugieren que RcsB es el regulador principal, con RcsA como proteína auxiliar. La sobreexpresión de RcsB es suficiente para activar los genes *wca* en ausencia de RcsA (Brill *et al.* 1988). Sin embargo, no se detecta expresión de estos genes en ausencia de RcsB, sin importar el nivel de RcsA.

Aunque RcsA no sea absolutamente requerida para la expresión de los genes *wca*, un aumento de los niveles de RcsA aumenta la expresión, sugiriendo que algunas señales de regulación pueden estar detectando cambios en la disponibilidad de RcsA. Altos niveles de RcsA inducen la síntesis de la cápsula, incluso cuando la señal que activa a RcsC no está

presente (Brill *et al.* 1988). Así, en un mutante *lon*, la estabilización de RcsA es responsable de la apariencia mucosa de las colonias.

La región necesaria para la acción de RcsA y RcsB se mapeó aproximadamente a 100 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Experimentos *in vitro* llevados a cabo con las proteínas RcsA y RcsB purificadas de *E. amylovora* demostraron que sólo cuando ambas proteínas están presentes se unen al ADN, lo que es visible en experimentos de retardo en gel, y activan la transcripción (Wehland *et al.* 1999). Se ha determinado una secuencia consenso para esta unión mediante estudios de mutagénesis. Estas secuencias también están presentes en la región promotora del propio gen *rcaA* en *E. coli*, *Salmonella* y *Klebsiella*. Con todos estos datos se ha definido la “caja RcsAB”.

b) Independiente de RcsA

En estos casos, el sitio de unión de RcsB a estos promotores está localizado inmediatamente corriente arriba de la región -35 del sitio de unión de la ARN polimerasa. Un ejemplo de este caso es el promotor p1 de *osmC*. Se ha visto que la forma activada de RcsB es capaz de unirse a este sitio en estudios de protección de ADNasa (Sturny *et al.* 2003), pero esta unión no es suficientemente fuerte para verla en experimentos de retardo en gel (Davalos-Garcia *et al.* 2001). La presencia de RcsB era suficiente para estimular la transcripción desde este promotor y también para aumentar la unión de la ARN polimerasa. Esto sugiere que estos sitios de unión de RcsB requieren la unión cooperativa de RcsB y la ARN polimerasa. Análisis de delección y mutación de los sitios de unión de RcsB independiente de RcsA sugieren un consenso relacionado, pero distinto, al de la caja RcsAB.

En resumen, el conocimiento actual de los mecanismos de acción de RcsB sugiere que para la regulación por RcsB solo, esta proteína se une en forma de homodímero a la región inmediatamente anterior a la -35, y probablemente requiere la interacción con la ARN polimerasa para

estabilizar esta unión y permitir la activación. La secuencia de unión en la regulación por RcsA y RcsB está más lejana del inicio de la transcripción, RcsA y RcsB se unen como heterodímero, y en este caso, RcsA estabiliza la unión de RcsB.

7.4. Dianas conocidas del sistema Rcs

a) Genes de la cápsula

La identificación del sistema Rcs derivó de su papel en la expresión de los genes del polisacárido extracelular de ácido colánico, los genes *wca* (Gottesman *et al.* 1985). Estos genes forman parte de un gran operón de 19 genes (Stevenson *et al.* 1996). Debido a la longitud del operón es necesaria la presencia de un antiterminador, RfaH, para la transcripción a través del operón. Una secuencia “JUMPstart” en la primera parte de la región transcrita codifica la secuencia de reconocimiento de RfaH, y es característica de operones de cápsula y lipopolisacáridos de muchos organismos (Leeds y Welch 1997, Rahn y Whitfield 2003). La cápsula de ácido colánico se sintetiza principalmente a bajas temperaturas. En condiciones de estrés, cuando hay intensa letalidad, muchas de las bacterias que sobreviven son mucosas (Gottesman y Stout 1991). Su expresión depende tanto de RcsB como del corregulador RcsA, aunque éste no es absolutamente esencial, ya que mutantes con activación permanente de RcsB no requieren RcsA para expresar los genes de la cápsula a alto nivel. Debido a que la estabilidad de RcsA está regulada por Lon, esta proteína es un regulador indirecto de la síntesis de la cápsula.

Otros organismos usan el sistema Rcs para regular la síntesis de cápsulas alternativas en lugar de la de ácido colánico, llamadas cápsulas tipo I (Majdalani y Gottesman 2005).

b) El operón *flhDC*

Para la síntesis de flagelos se requiere una serie de genes organizados en un sistema jerárquico, en el que se distinguen tres niveles (Kutsukake *et al.* 1990, Frye *et al.* 2006). La clase I está constituida por el operón *flhDC*. Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heteromultimérico (FlhD₂FlhC₂) necesario para activar la transcripción dependiente de σ^{70} de los genes de clase II. La clase II comprende varias unidades transcripcionales implicadas en la síntesis y ensamblaje de la estructura basal del flagelo, pero también genes cuyos productos se ensamblan más tardíamente, como *flgK*, *flgL* y *fliD*, y los genes reguladores *fliA*, y *flgM*. El gen *fliA* codifica el factor de transcripción específico de flagelos σ^{28} , que dirige la transcripción de los genes de clase III. Entre los productos de los genes de la clase III hay elementos estructurales del flagelo y proteínas que intervienen en quimiotaxia, como Tar, Tsr y Trg. La situación se complica si se tiene en cuenta que los genes *flgM*, *flgN*, *flgK*, *flgL*, *fliA*, *fliD*, *fliS* y *fliT* se transcriben tanto desde promotores de clase II como desde promotores de clase III. Así, *flgAMN* se transcribe desde un promotor de clase II y *flgMN* desde un promotor de clase III. Esto se esquematiza en la **Figura I.11**

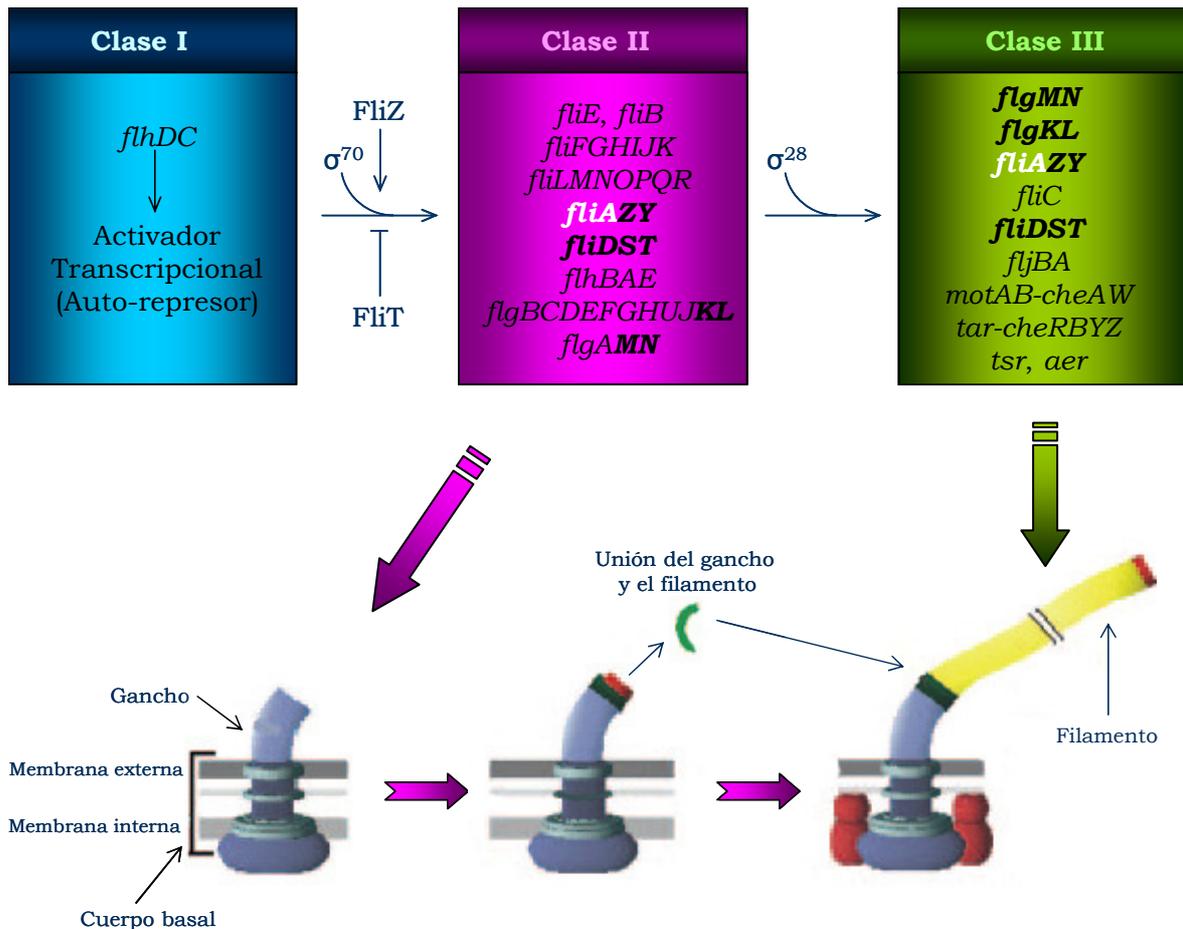


Figura I.11. Esquema de la organización jerárquica de la expresión de los genes flagelares. Los genes en negrita pertenecen tanto a la clase II como a la clase III. El gen *fliA* codifica el factor σ^{28} , necesario para la síntesis de los genes de flagelo. Figura adaptada de Frye y colaboradores (Frye *et al.* 2006).

El promotor del operón *fhDC* tiene al menos 6 inicios de transcripción diferentes (Yanagihara *et al.* 1999) y su expresión se halla bajo el control de varios reguladores. Entre ellos se encuentra el sistema Rcs, que ejerce un control negativo (Francez-Charlot *et al.* 2003). En consecuencia, la síntesis de flagelo está regulada por el sistema Rcs. Como resultado de esta regulación, las bacterias son menos móviles cuando RcsB está sobreexpresado o activado, y tienen gran movilidad en mutantes *rscB*. Esta regulación se descubrió en un escrutinio genético de fusiones transcripcionales reguladas por RcsB en *E. coli* (Francez-Charlot *et al.* 2003). Esta regulación negativa de *fhDC* está de acuerdo con otros indicios de menor movilidad en condiciones que inducen la síntesis de

cápsula.

c) *ftsZ*

Fue el primer gen descrito regulado por RcsB independientemente de RcsA. Se encontró que estaba regulado por el sistema Rcs en una búsqueda de supresores multicopia de un mutante *ftsZ* sensible a temperatura (Gervais y Drapeau 1992, Gervais *et al.* 1992). Este gen codifica una proteína esencial de división celular, responsable de la formación del septo. La supresión del mutante sensible a temperatura era debido al incremento de la transcripción de *ftsZ*. Este gen tiene varios promotores, y uno de ellos, *ftsA1p* es dependiente de RcsB, que tiene un sitio de unión justo al lado de la región -35.

d) Otros genes

Tras la caracterización del sistema Rcs como un sistema de dos componentes, se han realizado varios estudios de “microarray” que han conducido a la caracterización de nuevos miembros del regulón Rcs en *E. coli*. Otros se definieron mediante búsqueda de reguladores utilizando plásmidos multicopias. Entre los genes que se han descrito como nuevos miembros de este regulón están RprA (ARN regulador) (Majdalani *et al.* 2002), *osmC* (proteína periplásmica inducida osmóticamente) (Davalos-Garcia *et al.* 2001) y *katE* (catalasa) (Majdalani y Gottesman 2005).

Además, existen indicios que sugieren un posible papel del regulón Rcs en las últimas etapas de formación de biofilm. Mutantes en los genes *wca* no forman biofilms de forma correcta (Danese *et al.* 2000). Mientras que el ataque inicial de las células a la superficie es normal, la acumulación de células es menor que en la estirpe silvestre, y el biofilm final no forma la estructura en tres dimensiones normal. En un mutante *rscC* de pérdida de función, la tasa de formación de biofilm es menor que en la estirpe silvestre (Ferrières y Clarke 2003). Además, el movimiento de las células en una superficie sólida (“swarming”) es uno de los pasos principales en este proceso (Harshey 2003), y mutantes en *rscC* o *rscD* realizan un movimiento de tipo “swarming” más rápido que la estirpe

silvestre (Takeda *et al.* 2001).

7.5. Activación del sistema Rcs

La complejidad del regulón Rcs permite que las señales puedan entrar en la cascada de señalización en varias etapas, afectando a la fosforilación o defosforilación de RcsB, RcsD y RcsC. Las señales también pueden conducir a cambios en el nivel de síntesis de estos reguladores y en el nivel de acumulación de RcsA. Actualmente se sabe que la mayoría de las señales actúan sobre RcsC, aunque no se sabe cómo operan ni cómo se relacionan con las funciones de los genes diana del regulón.

a) Alteraciones en la superficie celular

Mutaciones que conllevan la pérdida de la integridad de la superficie celular provocan la activación del sistema Rcs, como por ejemplo, mutaciones en los genes *rfa*, implicados en la síntesis del lipopolisacárido, el componente principal de la superficie celular. Mutaciones en otros componentes de la superficie celular, como glucanos periplásmicos (codificados por los genes *mdo*) u oligosacáridos derivados de membrana también lo activan (Ebel *et al.* 1997). Mutantes en *pgi*, que son incapaces de metabolizar la glucosa-6-fosfato adecuadamente, tienen inducida la síntesis de la cápsula. Mutaciones en *tolB* inducen la expresión de *ugd* de manera dependiente de RcsC y RcsB (Mouslim y Groisman 2003). Se ha visto que mutaciones en cualquiera de los componentes del sistema Tol producen la formación de vesículas de membrana externa y la liberación de contenido periplásmico (Bernadac *et al.* 1998). Esto afecta a la integridad de la membrana externa y al control de la osmolaridad, y por tanto activa el sistema Rcs.

b) Condiciones ambientales

Se han encontrado varias condiciones de crecimiento que conllevan la activación del sistema Rcs, aunque hacen falta más estudios para determinar si son todas características de las mismas condiciones de

estrés, o si reflejan distintas condiciones de activación.

Entre las condiciones encontradas está la desecación, posiblemente por inducir un estrés osmótico. Es dependiente de *rscB* y *rscC*, y la cápsula ayuda a las células a sobrevivir en este ambiente (Ophir y Gutnick 1994). Pruebas directas de choque osmótico confirmaron que activa el sistema de forma transitoria, dependiente de RcsC (Sledjeski y Gottesman 1996).

Bajas temperaturas, que en general activan la síntesis de cápsula, junto con altos niveles de zinc, también activan el sistema de manera dependiente de RcsC y RcsF (Hagiwara *et al.* 2003). El efecto del zinc también depende de PhoP y PhoQ, lo que sugiere que PhoP puede participar en la activación de este sistema, de manera directa o indirecta (Hagiwara *et al.* 2003).

Además, el paso de las células de un medio líquido a uno sólido también activa al sistema Rcs. Esta activación es dependiente de RcsC. Esto apoyaría la existencia de un posible papel del sistema Rcs en las fases tardías de formación de biofilm.

c) RcsF

Se identificó en un plásmido multicopia por su capacidad de suprimir una mutación en *ftsZ*, y más tarde se vio que activaba la síntesis de la cápsula de ácido colánico. El análisis de su secuencia sugiere que RcsF probablemente se localice fuera del citoplasma, siendo una lipoproteína anclada a la membrana externa. Experimentos genéticos de varios laboratorios colocan a RcsF por encima de RcsC en la cascada de señalización. En coherencia con esta idea, un mutante *rscC* activado permanentemente activa la transcripción de genes diana del sistema Rcs incluso en un mutante *rscF* (Majdalani *et al.* 2005). Otra prueba es que la expresión en multicopia de *rscF*, que como se ha dicho activa la síntesis de cápsula, deja de hacerlo en un fondo con una mutación nula en *rscC*.

Un indicio de que RcsF tiene un papel importante corriente arriba de RcsC en la señalización es que existen condiciones que activan el

sistema Rcs que no son capaces de activarlo en un mutante *rscF*. Un ejemplo se encuentra en los mutantes *rfa*, que codifican enzimas para la síntesis del núcleo del lipopolisacárido (Parker *et al.* 1992). La activación del sistema Rcs que se da en estos mutantes se elimina en mutantes *rscC* o *rscF* (Majdalani *et al.* 2005). Sin embargo, el efecto de activación de los mutantes *rfa* no provoca un aumento en la transcripción de *rscF* y es independiente del promotor *rscF*. Se deduce que tanto la sobreexpresión de RcsF desde un plásmido multicopia como algún otro cambio en RcsF independiente de transcripción pueden inducir la señalización a través del sistema Rcs.

d) Regulación sobre RcsA

Para la activación de los genes dependientes de RcsA es suficiente con la acumulación de este corregulador, incluso en ausencia de señales que activen RcsC o en un mutante *rscC*. Parece que la función de RcsA puede ser la de regular un subconjunto de genes del regulón RcsB en respuesta a señales diferentes, en tipo y momento de actuación, a las que afectan al resto del regulón (Majdalani y Gottesman 2005).

El promotor de *rscA* está regulado negativamente por H-NS, probablemente uniéndose directamente a la región -97 a -59 del inicio de la transcripción. Además, presenta regulación positiva por RcsA y RcsB. Otro regulador de *rscA* es GadE, que es un regulador que se une al ADN y ayuda a las células a sobrevivir al estrés ácido. La sobreexpresión de GadE incrementa la transcripción de *rscA*. Además, un pequeño ARN no codificante, DsrA, aumenta la transcripción de *rscA* cuando está presente en un plásmido multicopia, aunque un mutante *dsrA* tiene poco efecto sobre la síntesis de *rscA*.

Además de esta regulación transcripcional, se ha propuesto la posibilidad de una regulación traduccional debido a la existencia de una región no traducida de 132 nucleótidos conservados.

Por último, se conoce la existencia de regulación a nivel de proteína. Los niveles de la proteína RcsA son normalmente muy bajos debido a degradación por la proteasa Lon.

e) IgaA

El gen *igaA* de *Salmonella enterica* (Cano *et al.* 2001) es un gen esencial que posee homólogos en *Escherichia coli* (*yrfF*) y *Proteus mirabilis* (*umoB*). Análisis *in silico* y experimentos de fraccionamiento revelan que este gen codifica una proteína de membrana interna, que parece tener cinco dominios transmembrana (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). El gen *igaA* se identificó en un mutante puntual capaz de proliferar en fibroblastos cultivados (de ahí el nombre de *igaA*, “intracellular growth attenuator”). Este mutante, llamado *igaA1*, es mucoso y presenta defectos en virulencia (Cano *et al.* 2001) y movilidad (Cano *et al.* 2002). Estos fenotipos, así como la letalidad del mutante nulo, se suprimen con mutaciones en los genes *rcsB*, *rscC* o *rscD*, lo que sugiere que los fenotipos observados en estos mutantes se deben a la sobreactivación del sistema Rcs. Se piensa que la función de IgaA consiste en regular la activación de este sistema. Para ensayar esta hipótesis, se estudiaron los niveles de proteína RcsB, RcsC y RcsD en las estirpes *igaA1* y silvestre y se vio que no había diferencias entre las dos estirpes pese a existir un aumento de la síntesis de la cápsula, lo que indica que el sistema Rcs está activado (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Esta observación sugiere que IgaA regula la activación del sistema Rcs a nivel post-traducciona. Además, se sabe que la activación del sistema Rcs no se debe a inestabilidad de envuelta celular (una de las condiciones descritas para la activación del sistema), ya que no se observaba sensibilidad a detergentes iónicos (Domínguez-Bernal *et al.* 2004).

Una búsqueda de supresores de la letalidad del mutante *igaA* proporcionó dos clases fenotípicas de mutantes, que formaban colonias mucosas o no mucosas (Mariscotti y García-Del Portillo 2008). Pese a esta diferencia, todos los mutantes presentaban defectos en la integridad y la respuesta del sistema Rcs, aunque se encontraron condiciones en las que la supresión de la esencialidad de IgaA era posible sin la eliminación completa del sistema Rcs. Un mecanismo frecuente de supresión encontrado era la pérdida del sistema Rcs debido a deleciones de longitud variable.

Un aspecto llamativo de la proteína IgaA y el sistema Rcs es que parecen haber coevolucionado. El sistema Rcs completo (*rscC*, *rscD* y *rscB*) sólo está presente en genomas de bacterias entéricas (con excepciones en bacterias endosimbióticas), una distribución que coincide exactamente con la de ortólogos de *igaA* (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Es importante aclarar que aunque existen anotaciones de genes *rscC* en las bases de datos de bacterias no entéricas como *Pseudomonas aeruginosa*, el producto de este gen *rscC* no corresponde con el prototipo RcsC entérico. Sólo tiene un 30% de identidad en la región citosólica, y no tiene homología en el dominio periplásmico sensor, que en algunos casos incluso está ausente.

La **Figura I.12** presenta un esquema de la cascada de regulación del sistema Rcs, desde la activación del sistema hasta la activación o represión de los genes diana.

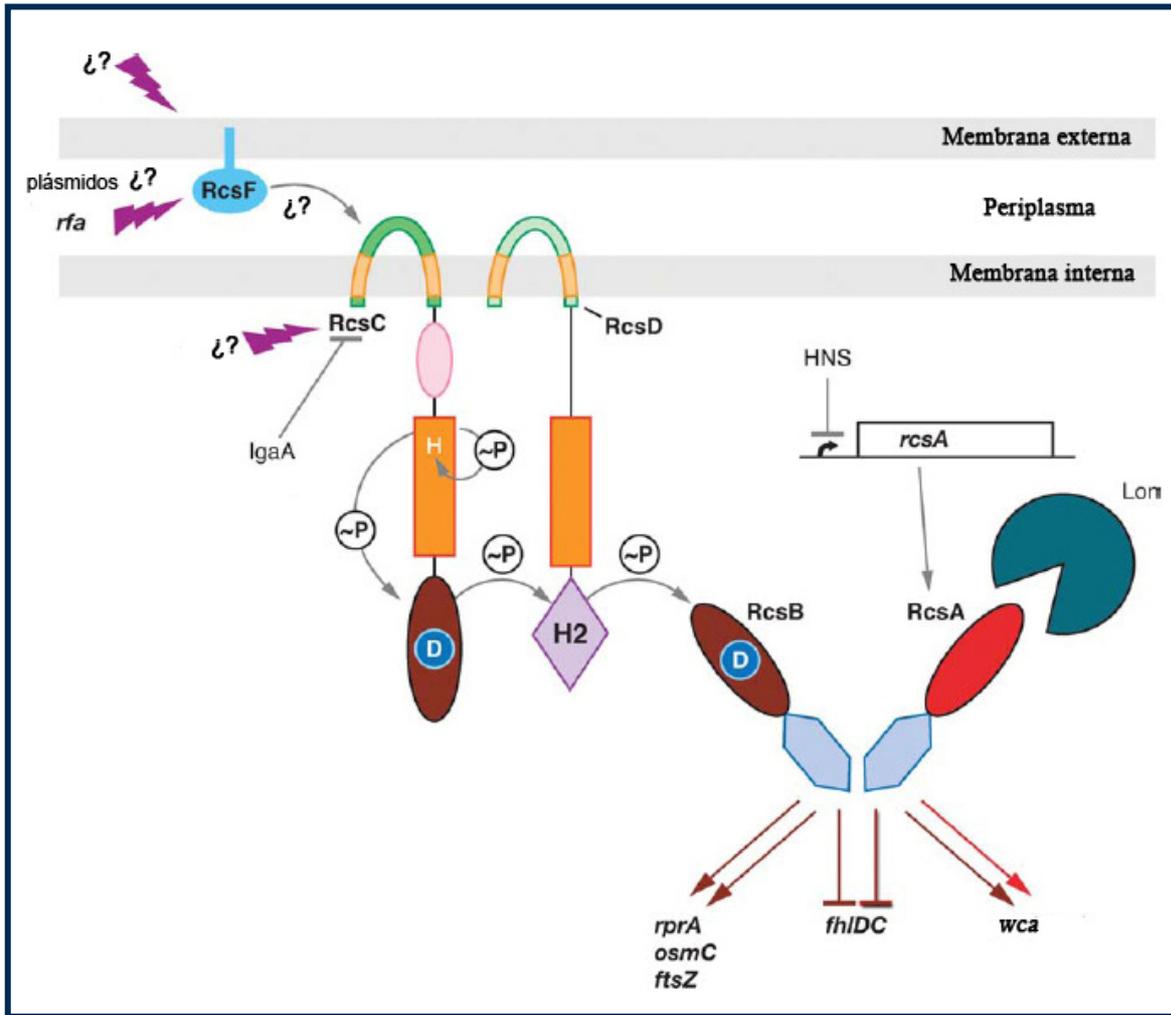


Figura I.12. Ruta de activación del sistema Rcs. Figura adaptada de Majdalani y Gottesman (Majdalani y Gottesman 2005).

OBJETIVOS

En el momento de iniciar esta Tesis, trabajos recientes de nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. García del Portillo habían descrito que alelos viables del gen esencial *igaA* activaban el sistema de transducción de señales Rcs, y que dicha activación atenuaba la virulencia de *Salmonella*. Se trataba, pues, de un fenómeno nuevo, prácticamente inexplorado y relevante en el campo de la patogénesis bacteriana. De ahí que se fijara como tema de la Tesis el análisis del regulón IgaA-Rcs por métodos genéticos y moleculares. En la práctica, el estudio se dividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar mutantes *rcs* constitutivos de *Salmonella enterica* y estudiar sus propiedades en el modelo de ratón BALB/c.
2. Diseñar y realizar escrutinios para identificar genes del regulón Rcs de *Salmonella enterica*, esperando identificar los implicados en la virulencia.
3. Estudiar la regulación del operón *srfABC*, asignado al regulón Rcs gracias a los escrutinios de esta Tesis, y establecer si SrfA, SrfB y SrfC eran proteínas secretadas.
4. Caracterizar la unidad transcripcional en la que se encuentra el gen *igaA* e identificar su promotor.
5. Realizar escrutinios genéticos para identificar reguladores del gen *igaA*.

6. Determinar el mecanismo de regulación de *igaA* por la proteína transductora de señales MviA, identificada en los escrutinios realizados para el objetivo anterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Estirpes bacterianas

Todas las estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* usadas en esta Tesis se incluyen en la **Tabla M1**. Las estirpes de *S. enterica* derivan del tipo silvestre ATCC 14028s (también conocida como ATCC14028 o simplemente 14028), excepto algunos derivados, que se detallan en el texto, que provienen del tipo silvestre LT2.

1.2. Bacteriófagos

Como bacteriófago transductor se usó P22 HT105/1 *int201* (Schmieger 1972). Para los ensayos de sensibilidad a P22 se usó el derivado H5, que porta una mutación en el gen *c2*. El gen *c2* de P22 es un equivalente del gen *cI* del fago λ , de modo que un mutante *c2* produce placas claras.

1.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta Tesis se describen en la **Tabla M2**.

Tabla M1. Estirpes bacterianas.

Estirpe	Genotipo	Referencia
55130	<i>pho-24</i> (PhoP constitutivo)	E. A. Groisman
TT10288	<i>hisD9953::MudJ</i> <i>his9944::MudI</i>	J. R. Roth
TT10423	<i>proAB47/F'Pro⁺Lac⁺</i> <i>zzf::Tn10dTc</i>	J. R. Roth
SV3329	LT2 <i>ompC396::Tn10</i>	
SV4439	<i>rcsC52::MudQ</i>	(Cano <i>et al.</i> 2001)
SV4451	<i>rcsA::MudJ</i>	
SV4514	<i>gmm::MudQ</i>	
SV4530	<i>igaA1</i>	(Domínguez-Bernal <i>et al.</i> 2004)
SV4573	<i>igaA::Cm/pBAD-igaA</i>	

SV4576	Dup [<i>arg</i> *MudQ* <i>cysG1573</i>] <i>igaA::lacZ</i>	
SV4582	<i>igaA::lacZ rcsC::MudQ</i>	
SV4608	<i>trg::MudJ</i>	
SV4609	<i>gmm-21::MudJ</i>	
SV4610	<i>flhDC5213::MudA</i>	
SV4632	<i>flhDC5213::MudQ</i>	
SV4633	<i>fliA::MudQ</i>	
SV4676 ^a	<i>srfB::MudJ</i>	
SV4699	<i>phoP7953::Tn10</i>	
SV4756 ^b	<i>rcsC53</i>	
SV4757 ^b	<i>rcsC54</i>	
SV4758 ^b	<i>rcsC55</i>	
SV4767 ^b	<i>rcsC56</i>	
SV4773	<i>igaA5</i>	(Domínguez-Bernal <i>et al.</i> 2004)
SV4918 ^a	<i>yjbH::MudJ</i>	
SV4919 ^a	<i>siE::MudJ</i>	
SV4920 ^a	<i>melB::MudJ</i>	
SV4921 ^a	<i>narH::MudJ</i>	
SV4922 ^a	<i>dcuB::MudJ</i>	
SV4923 ^a	STM2176::MudJ	
SV4924 ^a	<i>yhhJ::MudJ</i>	
SV4948 ^b	<i>rcsC58</i>	
SV4949 ^b	<i>rcsC59</i>	
SV4952 ^b	<i>rcsC60</i>	
SV4953 ^b	<i>rcsC61</i>	
SV4954 ^b	<i>rcsC62</i>	
SV4959 ^b	<i>rcsC63</i>	
SV4960 ^b	<i>rcsC64</i>	
SV4985	DUP [<i>hisH9962</i> * <i>cysA1586</i>]	MudP*
SV5009	<i>rcsC53 rcsB::Km</i>	
SV5010	<i>rcsC54 rcsB::Km</i>	
SV5011	<i>rcsC55 rcsB::Km</i>	
SV5012	<i>rcsC58 rcsB::Km</i>	
SV5013	<i>rcsC60 rcsB::Km</i>	
SV5014	<i>rcsC63 rcsB::Km</i>	
SV5049	Δ <i>rcsB::Cm^r</i>	
SV5090	<i>gmm::MudQ/pIZ1589</i>	
SV5091 ^a	<i>srfA::MudJ</i>	

SV5092 ^a	<i>yiaD::MudJ</i>	
SV5093	$\Delta rcsA::Cm^r$	
SV5094 ^a	<i>bapA::MudJ</i>	
SV5095 ^a	PSLT071::MudJ	
SV5106 ^a	STM1491::MudJ	
SV5190 ^{a, c}	<i>srfA::3xFLAG</i>	
SV5191 ^{a, c}	<i>srfB::3xFLAG</i>	
SV5192 ^{a, c}	<i>srfC::3xFLAG</i>	
SV5303 ^c	<i>prgH::lacZ</i>	J. López-Garrido
SV5373	$\Delta hilA$	J. López-Garrido
SV5379	$\Delta prgH$	J. López-Garrido
SV5451	<i>ssaV::Km^r</i>	
SV5452	$\Delta ssrB::Cm^r$	
SV5453	<i>flhA::Cm^r</i>	
SV5470 ^c	<i>ssaV::lacZ</i>	
SV5589	<i>igaA::Km^r rcsB::Cm^r</i>	
SV5590	<i>igaA::lacZ</i> $\Delta rcsB$	
SV5614	LT2 Δhns	A. Serna
SV5663	<i>lon::Tn10dTc</i>	
SV5664	<i>mviA::Tn10dTc</i>	
SV5665	<i>mviA::Tn10dTc</i> $\Delta rcsB$	
SV5737	<i>rcsB::lacZ</i>	
SV5738	<i>rcsB::3XFLAG</i>	
DH5a	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi1</i> (Hanahan 1983) <i>recA1 gyrA96 relA1</i> $\Delta lacU189$ ($\Phi 80 lacZ\Delta M15$)	

^a Estas estirpes se usaron también en fondo *rcsC54*, *igaA5*, *igaA5* $\Delta rcsB$, *igaA5 rcsC::Cm*, *igaA5 rcsA::Cm*, *flhDC5213::MudQ* y *fliA::MudQ*, como se cita en el texto.

^b Los derivados *gmm-21::MudJ*, *flhDC5213::MudA*, *rcsA::MudJ* y *rcsA::Cm* de estas estirpes se usaron como aparece en el texto.

^c Estas estirpes se usaron también en fondo *phoP7953::Tn10*, *pho-24*, *ssrB::Cm* y $\Delta hilA$, como se indica en el texto.

Las estirpes SV pertenecen a la colección del laboratorio.

DH5a es una estirpe de *E. coli*, el resto son estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium.

Tabla M2. Plásmidos.

Plásmido	Resistencia	Referencia
pBAD18	Ap ^r , <i>araC</i> , P _{BAD} , oripBR322	(Guzman <i>et al.</i> 1995)
pBluescriptIISK(+)	<i>lac⁺</i> , Ap ^r	Stratagene
pCE36	Km ^r , FRT <i>lacZY</i> , oriR6K	(Ellermeier <i>et al.</i> 2002)
pCE37	Km ^r , FRT <i>lacZY</i> , oriR6K	(Ellermeier <i>et al.</i> 2002)

pCE40	Km ^r , FRT <i>lacZY</i> , oriR6K	(Datsenko y Wanner 2000)
pCP20	Ap ^r , Cm ^r , Ts(30°C)	(Datsenko y Wanner 2000)
pGemT [®] -easy	Ap ^r	Promega
pIC552	<i>galK'</i> , <i>lac⁺</i> , Ap ^r	(Macián <i>et al.</i> 1994)
pIZ898	Ap ^r	(Camacho y Casadesús 2002)
pIZ1586	Ap ^r	
pIZ1589	Ap ^r	
pKD3	Cm ^r , Ap ^r	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD4	Km ^r , Ap ^r	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD13	Km ^r , Ap ^r	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD46	Ap ^r , Ts(30°C)	(Datsenko y Wanner 2000)
pNG1166	Ap ^r	(Cano <i>et al.</i> 2002)
pNK2880	<i>Ptac-tnpA ats-1 ats-2</i> Ap ^r	(Kleckner <i>et al.</i> 1991)
pSUB11	Km ^r , 3XFLAG	(Uzzau <i>et al.</i> 2001)

El prefijo pIZ está registrado a nombre de J. Casadesús en el Plasmid Referente Center, Universidad de Stanford, California.

2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo fueron 37°C con agitación suave (180 rpm), tanto en medio rico como en medio mínimo.

Para condiciones de microaerofilia las condiciones fueron 37°C, sin agitación.

2.2. Medios y soluciones

El medio de Luria y Bertani (**LB**) se usó como medio rico (Maloy 1990). El agar se añadió a una concentración de 18 g/l para el medio sólido, y de 8 g/l para el agar de cobertera.

Como medio mínimo se usó habitualmente el **medio E** (Vogel y Bonner 1956). Además de la fuente de carbono habitual (glucosa), este medio contiene citrato, que es una fuente de carbono utilizable por *Salmonella*. La fuente de carbono (glucosa) se empleó a una concentración final de 2 g/l. El medio E se preparó a partir de una mezcla de sales 50 veces más concentradas (Ex50), que se esterilizó con cloroformo. En el momento de preparar el medio, el concentrado se diluyó 50 veces en agua destilada estéril o en agar-agua autoclavado. La fuente de carbono se añadió posteriormente a partir de una solución concentrada estéril. Los suplementos se añadieron a las concentraciones descritas por Maloy (Maloy 1990).

El medio **mínimo LPM** se usó como imitador de las condiciones existentes en el citoplasma de las células eucariotas (Coombes *et al.* 2004). Está compuesto por KCl 5 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7,5 mM, K_2SO_4 0,5 mM, casaminoácidos 0,1%, glicerol 38 mM, MES 80 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 337,5 μM , MgCl_2 8 μM . Se llevó a pH 5,8 con KOH.

El medio **mínimo ISM** también se usó como imitador de las condiciones intracelulares de la célula eucariota (Headley y Payne 1990). La composición es K_3PO_4 170 mM, K_2SO_4 6 mM, NaCl 5 mM, MgSO_4 0,5 mM, Cl_2Ca 1 μM , glucosa 0,4%, ácido nicotínico 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y NH_4Cl . Se lleva a pH 5,5 con H_3PO_4 .

El **agar EBU** es LB al que se añaden, por cada 100 ml de medio, 0,5 ml de glucosa al 50%, 1 ml de K_2HPO_4 al 25%, 125 μl de azul de Evans al 1% y 250 μl de uranina (también llamada fluoresceína) al 1% (Maloy *et al.* 1996).

El **caldo de fagos** se preparó mezclando 100 ml de NB (Nutrient Broth), 2 ml de sales Ex50, 1 ml de glucosa al 20% y 0,1 ml de un lisado de fago obtenido sobre una estirpe silvestre (habitualmente LT2).

El **medio de movilidad** se preparó como el LB pero sin extracto de levadura (Gillen y Hughes 1991). La concentración de agar para placas fue de 2,5 g/l.

Para **diluir** fagos y bacterias se utilizó una solución salina de PBS a pH 7,2, que se preparó diluyendo el concentrado de sales PBS10x en agua destilada. Las sales PBS10x se preparan añadiendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ x 7H₂O 4,3 mM y KH₂PO₄ 1,4 mM. Se ajusta el pH a 7,3.

La **Tabla M3** es una lista de agentes selectivos y otros compuestos químicos. En la misma tabla se indica las concentraciones a las que se utilizaron.

Tabla M3. Concentraciones de agentes selectivos y otros compuestos químicos

Compuesto	Medio rico (µg/ml)	Medio mínimo (µg/ml)
Ampicilina	30 ^a -100 ^b	15
Kanamicina	50	125
Tetraciclina	20 ^a -5 ^b	10
Cloranfenicol	20	5
EGTA	4 mg/ml	4 mg/ml
X-gal	40	25

^aPara resistencias cromosómicas. ^bPara resistencias plasmídicas.

3. TRANSFERENCIA GENÉTICA

3.1. Transformación de *E. coli* con alta eficiencia

Se prepararon células competentes según una variante del método de Inoue y colaboradores (Inoue *et al.* 1990), que permite una alta frecuencia de transformación (habitualmente, de 5×10^7 a 5×10^8 transformantes por μg de ADN plasmídico). Un cultivo saturado de la estirpe receptora (habitualmente DH5 α) se diluyó 100-1000 veces en 200 ml de medio SOB (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl y 5 ml de KCl de un *stock* 250 mM; se llevó hasta pH 7,0 con NaOH 10 M, se autoclavó y se le añadieron 5 ml de MgCl₂ 2 M). Se incubó con agitación a 22°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ aproximada de 0,5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo y se incubó durante 10 minutos. Las células se recogieron por centrifugación a 2500 g a 4°C durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 ml de TB frío. Se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10 minutos en hielo. Se recogieron las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 20 ml de TB frío. Se añadió 1,5 ml de DMSO y, tras incubarlo 10 minutos en hielo, se hicieron alícuotas de 0,4 y 1 ml, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células así preparadas mantienen su competencia durante varios meses. La composición del tampón TB es la siguiente: Pipes (ácido libre) 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, llevado todo ello a pH 6,7 con KOH (o con HCl, según sea necesario). A continuación se añade MnCl₂ (concentración final: 55 mM) y se esteriliza por filtración.

Para la transformación, una alícuota de células competentes se mezcló con la preparación de plásmido, y se incubó en hielo durante 5-15 minutos. A continuación, la mezcla se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos, se enfrió en hielo y se añadió 1 ml de LB. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, se concentró en 100 μl y se sembró en una placa de medio selectivo.

3.2. Electroporación en *E. coli* y *S. enterica*

El método es el mismo para ambas especies: de un cultivo saturado

reciente se toman 0,2 ml y se inoculan en 10 ml de LB. Se cultiva a 37°C con agitación. Cuando ha llegado a fase exponencial, las células se recogen por centrifugación (30 segundos a 13000 rpm). En muchos casos también se obtienen buenos resultados con cultivos en fase estacionaria temprana. A continuación, las células se resuspenden en 5 ml de glicerol al 10% frío y estéril. La suspensión se agita en el vórtex y se centrifuga durante 30 segundos en la microcentrífuga. Se repite la operación y las células se resuspenden en 2 ml de glicerol al 10%, frío y estéril. Se vuelven a recoger las células por centrifugación y se resuspenden en 500 µl de glicerol al 10% frío y estéril. La suspensión se agita en el vórtex y se centrifuga durante 30 segundos en la microcentrífuga. Por último se resuspende en 120 µl de glicerol al 10%, frío y estéril y se coloca en hielo hasta el momento de usarla. Con este procedimiento se obtienen células electrocompetentes para dos electroporaciones; si se quieren volúmenes mayores, se pueden aumentar proporcionalmente las cantidades. La electroporación propiamente dicha se realiza mezclando 3,5 µl de ADN plasmídico con 50 µl de células electrocompetentes y transfiriendo la mezcla a una cubeta previamente enfriada. A continuación se somete a una descarga eléctrica en el electroporador (25 µF, 200 ohmios y 2,5 kV). El electroporador empleado fue un Electrocell Manipulator 600 fabricado por BTX, San Diego. Se añade 1 ml de LB a la cubeta y la mezcla se transfiere a un tubo de ensayo, que se agita a 37°C durante 1 hora. Tras la incubación, las células se recogen por centrifugación y se siembran en medio selectivo.

3.3. Transducción

a) Preparación de lisados de P22

Se mezclan 4 ml de caldo de P22 con 1 ml de un cultivo saturado de la estirpe donadora. La mezcla se incuba 8–16 horas con agitación suave a 37°C (8 horas suele ser el tiempo idóneo para que haya lisis celular máxima, aunque el cultivo no se aclara). Los fagos se recogen centrifugando el lisado 20 minutos a 4500 rpm en una centrífuga de

mesa. El sobrenadante se recoge en un tubo con tapón de rosca. Se añaden 800 µl de cloroformo y se agita en un vórtex. Los lisados se mantienen unas horas a temperatura ambiente y luego se guardan a 4°C; en esas condiciones, son estables durante meses o años (Maloy 1990).

b) Titulación de los lisados

Se añaden unos 100 µl de un cultivo saturado de la estirpe indicadora a varios tubos con 2,5 ml de LB de cobertera mantenido en sobrefusión a 45°C. A cada tubo se añaden 100 µl de diluciones seriadas del lisado. Inmediatamente se vierte todo el contenido del tubo sobre una placa de LB y se extiende sobre toda la superficie. Se deja solidificar sobre la mesa y posteriormente se incuba a 37°C hasta observar la aparición de calvas de lisis (Maloy 1990).

c) Transducción en medio sólido

Este método es adecuado para obtener transductantes independientes (no gemelos). Consiste en mezclar y esparcir sobre una placa de medio selectivo 0,1 ml de un cultivo saturado de la estirpe receptora y 0,1 ml de una dilución adecuada del lisado de la estirpe donadora. Se incuba a 37°C hasta la aparición de colonias. Cuando se selecciona la transferencia de una resistencia a antibiótico, la mezcla se realiza en una placa de medio no selectivo (LB) y se incuba durante 5-8 horas para permitir la expresión de la resistencia, antes de poner a la estirpe receptora en contacto con el agente selectivo. Posteriormente la placa se replica con un terciopelo a medio selectivo, incubando a 37°C hasta la aparición de colonias. Cuando se selecciona un marcador de resistencia a tetraciclina, la mezcla de transducción puede hacerse directamente sobre medio selectivo.

d) Transducción en líquido

En un tubo estéril se mezclan alícuotas de un cultivo saturado de la estirpe receptora y de una dilución adecuada del lisado de la estirpe donadora. La mezcla se incuba a 37°C con agitación suave entre 30 y 90

minutos (dependiendo del marcador a transducir). La mezcla (diluida y sin diluir) se siembra en medio selectivo y se incuba a 37°C hasta la aparición de colonias.

Este método no proporciona transductantes independientes (aunque en incubaciones menores de 30 minutos, apenas da tiempo para que los transductantes se dividan, por lo que la proporción de gemelos debe ser mínima). Sin embargo, tiene las ventajas de ser más rápido y repetitivo, y de permitir diluciones de la mezcla de transducción, con lo que se pueden usar distintas multiplicidades de infección para una misma transducción.

e) Limpieza de lisógenos en los transductantes

Los transductantes, además de haber recibido el marcador seleccionado, pueden haber sido infectados por P22. Por tanto, pueden ser pseudolisógenos (al impedir la integración, la mutación *int* dificulta o retrasa la formación de lisógenos verdaderos). Con el tiempo, los pseudolisógenos se hacen resistentes o inmunes a nuevas infecciones por P22 y a partir de ese momento no pueden ser lisados ni transducidos. De ahí que convenga eliminar los pseudolisógenos si la estirpe ha de ser usada en posteriores experimentos de transducción. Para ello se aíslan colonias del transductante en placas EBU (con antibióticos, si es necesario). En este tipo de placas, los pseudolisógenos son oscuros y las colonias libres de P22 son claras. La diferencia de color se debe a la existencia de lisis en las colonias de pseudolisógenos; dicha lisis acidifica la colonia y hace virar el compuesto indicador. Generalmente se necesitan dos o tres siembras sucesivas en cajas verdes o EBU para detectar aislados libres de fago. Dichos aislados se forman por segregación espontánea de células libres de profago. Se considera que un transductante está "limpio" cuando en el aislamiento correspondiente no aparece ninguna colonia de color verde oscuro (Maloy *et al.* 1996).

f) Ensayo de sensibilidad a P22

En las placas EBU, los aislados de color claro pueden ser lisógenos en los que no se está produciendo lisis. Estos aislados son resistentes a P22 y pueden ser confundidos con aislados libres de fagos. Ello hace aconsejable disponer de un ensayo alternativo para determinar si una estirpe es sensible a P22. Con este objeto se usa el mutante virulento H5. Sobre una placa de LB o EBU se extiende una estría de un lisado de H5 y se deja secar. Posteriormente se cruzan, perpendicularmente a la estría de H5, estrías de las estirpes a ensayar, así como una estría de una estirpe indicadora (sensible a P22) como control. Las estirpes sensibles sólo presentan crecimiento hasta la estría de H5, mientras que las resistentes crecen cruzando la estría (Maloy *et al.* 1996).

4. OTROS MÉTODOS GENÉTICOS

4.1. Construcción de estirpes

Habitualmente, los marcadores genéticos se transfirieron de una estirpe a otra por transducción. Se transdujo la estirpe receptora con un lisado de P22 obtenido sobre una estirpe con el marcador deseado. Dado que todos los marcadores usados eran seleccionables, la transducción se sembraba directamente en medio selectivo. Por ejemplo, para seleccionar la transducción de un alelo *rcsB::Cm*, la mezcla de transducción se sembró en medio con cloranfenicol. Siempre que era posible se comprobaba que el transductante presentaba el fenotipo adecuado.

4.2. Mutagénesis con MudJ

Para la mutagénesis con MudJ se usan dos derivados del fago Mu: MudJ y MudI (Casadaban y Cohen 1979, Casadaban y Chou 1984, Castilho *et al.* 1984). El primero confiere resistencia a kanamicina, carece de funciones de transposición y lleva un operón *lac* sin promotor cerca de un extremo. MudI lleva el gen de la transposasa y confiere resistencia a

ampicilina. Un lisado de P22 obtenido sobre un doble mutante *hisD::MudJ hisA::MudI* (estirpe TT10288) permite la obtención de inserciones del transposón defectivo *MudJ* en el genoma de la estirpe receptora gracias a la complementación transitoria en cis de las funciones de transposición (Hughes y Roth 1988). En la estirpe donadora, el elemento *MudI* está orientado de modo que las funciones de transposición son fácilmente cotransducibles con el *Mu* defectivo (**Figura M1**). P22 no puede empaquetar íntegros los dos derivados de *Mu*, ya que el fragmento excede la capacidad de su cápsida. Por tanto, si se selecciona la transducción de *MudJ*, es altamente improbable que se cotransduzca el elemento *MudI* entero, al menos a baja multiplicidad de infección. En cambio, con cierta frecuencia se cotransducen los genes de transposición de *MudI*. Ello permite la complementación en cis y la transposición del elemento *MudJ* antes de que el fragmento transducido sea degradado o se pierda por dilución.

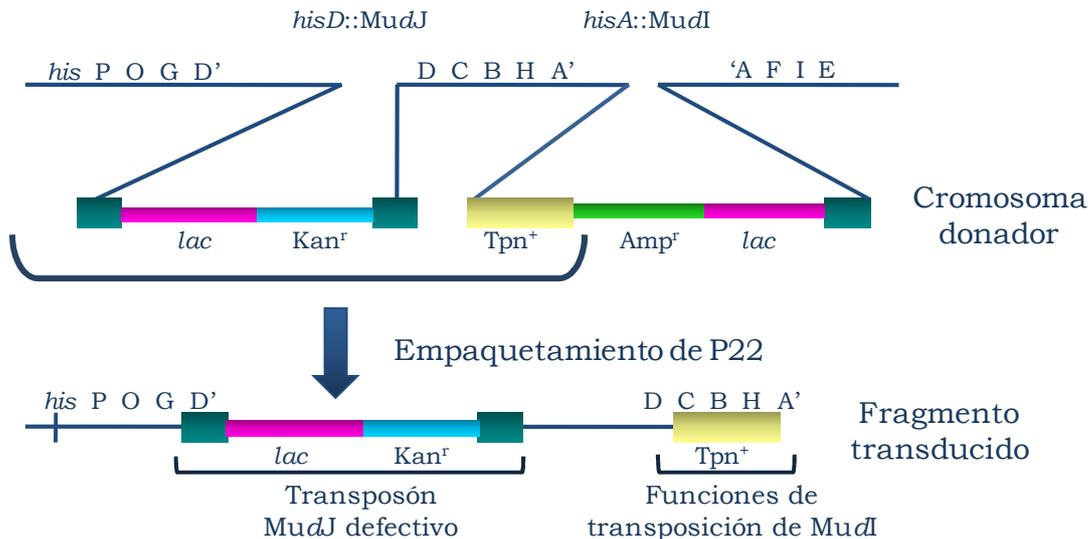


Figura M1. Obtención de inserciones del transposón defectivo *MudJ*. El transposón defectivo *MudJ* y los genes que rigen las funciones de transposición de *MudI* pueden ser empaquetados en una misma cápsida de P22, permitiendo la complementación en cis tras la inyección en la célula receptora.

4.3. Mutagénesis con *Tn10dTc*

En primer lugar se obtuvo una colección de insertos de Tn10dTc mediante una transducción no homóloga (Elliott y Roth 1988). Para ello, se preparó un lisado de una estirpe que llevaba una inserción de Tn10dTc en un F-prima. Con este lisado se transdujo otra estirpe que portaba el plásmido pNK2880 (Kleckner *et al.* 1991). Este plásmido lleva la transposasa ATS, permitiendo así la complementación en *trans* del elemento defectivo Tn10dTc. La transposasa ATS tiene menor especificidad que la transposasa silvestre de Tn10. En la transducción, el transposón entra en la bacteria receptora en un fragmento del F-prima (dado el gran tamaño de éste, >100 kb, no puede ser encapsidado entero en un virión de P22). El transposón no puede pasar por recombinación homóloga al cromosoma, ya que no existe homología entre éste y el F-prima.

4.4. Obtención de colecciones ("pools") de transductantes independientes

Para hacer colecciones de insertos independientes de cualquier transposón (MudJ o Tn10d), la transducción se hace en medio sólido, y el medio de selección es LB con antibióticos y EGTA 10 mM. Este agente quelante capta el ion Ca²⁺ impidiendo el ensamblaje de la cápsida del fago P22; de esta forma se evitan las reinfecciones y se reduce la probabilidad de aparición de lisógenos. El EGTA se prepara a una concentración de 1 M. Para 1 litro de solución se añaden 378,75 g de EGTA, 80 g de NaOH y unos 600 ml de agua destilada; se agita hasta la disolución y se ajusta a pH 7 con HCl. Por último se enrasa el volumen a 1 litro y se autoclava. Los transductantes se recogen con un asa de siembra tras verter 2-3 ml de LB líquido con EGTA en las cajas. Se pueden mezclar colonias obtenidas en cajas diferentes. Habitualmente, las colecciones se hacen con 2000-5000 colonias, y el resultado es una suspensión muy densa. A continuación, una dilución apropiada (100-200 veces) se inoculara en LB con EGTA y antibiótico, y se incuba hasta fase estacionaria temprana. En ese momento, el cultivo se centrifuga y las células se lavan 3-4 veces con tampón E, para eliminar por completo el EGTA; finalmente las células se

resuspenden en LB y se prepara un lisado por el procedimiento habitual. En la suspensión de fagos que se obtiene están representados los varios miles de insertos independientes que forman la colección.

4.5. Mapeo por cotransducción

Se transdujo un receptor apropiado con P22 HT y se seleccionó la transferencia de un marcador dominante. Posteriormente los transductantes se replicaron a medios adecuados para detectar la cotransferencia de marcadores no seleccionados. Las frecuencias de cotransducción inferiores al 1% no se tuvieron en cuenta (Maloy 1990).

5. ENSAYOS DE INFECCIÓN MIXTA

Para los ensayos de virulencia se usaron ratones BALB/c de 8 semanas (Charles River Laboratorios, Santa Perpetua de Mogoda, España) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Beuzón y Holden 2001). Para la inoculación por vía oral se utilizaron cultivos saturados crecidos a 37°C sin agitación. La inoculación se llevó a cabo suministrando 25 µl de solución salina con 0,1% de lactosa y 10⁸ ufc. Para las infecciones por vía intraperitoneal, cultivos saturados en LB a 37°C con agitación se diluyen 1:100 en medio fresco y se dejan crecer hasta D.O.₆₀₀ 0,35-0,6. A los ratones se les suministraron 0,2 ml de solución salina con 10⁵ ufc. Las bacterias se recuperaron del bazo transcurridas 48 h desde el inicio de la infección en el caso de las infecciones intraperitoneales, y 6 días en el caso de las orales. Se realizó el conteo de ufc en medio selectivo. Se calculó el índice de competitividad (IC) para cada mutante como la proporción entre el mutante y la estirpe silvestre a la salida (bazo) frente a la misma proporción en el inóculo inicial.

6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1. Extracción de ADN plasmídico para clonaciones

Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el protocolo de lisis alcalina (Birnboim 1983, Sambrook *et al.* 1989), con ligeras modificaciones. No se empleó lisozima por resultar innecesaria para la lisis bacteriana e incapaz de aumentar el rendimiento. Habitualmente se realizaron minipreparaciones de 3 ml de cultivo en tubos eppendorf. Las células se recogieron tras dos centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante 30 segundos. El sedimento se resuspendió en 100 µl de GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se lisó con 200 µl de NaOH 0,2 N, SDS 1%, y se incubó 10 minutos en hielo. Se neutralizó con 150 µl de acetato potásico 3 M, ajustado a pH 4,8 con ácido acético, y se incubó al menos 10 minutos en hielo. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf, se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) hasta conseguir una interfase limpia (opcionalmente, después se realiza una extracción con cloroformo-isoamílico 24:1) y se precipitó con 2-2,5 volúmenes de etanol al 96%. Tras incubar 30 minutos como mínimo a -20°C, se centrifugó 15 minutos en una microcentrífuga a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó 1 minuto en las mismas condiciones, se secó al vacío y se resuspendió en 20-50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

6.2. Extracción de ADN plasmídico para análisis de clones (boiling preps)

Para el análisis sistemático de transformantes se utilizó el método de

extracción de ADN plasmídico de Holmes y Quigley (Holmes y Quigley 1981) con modificaciones. Las células se recogieron por centrifugación a partir de 1,5 ml de cultivo saturado. El sedimento se resuspendió en 110 µl de STETL (sacarosa 8%, Tritón X-100, Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM, lisozima 0,5 mg/ml). A continuación, el tubo se introdujo durante 30 segundos en agua hirviendo y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos en una microcentrífuga. El precipitado obtenido se retiró con un palillo estéril previamente mojado en una solución de RNasa (10 mg/ml). Al sobrenadante obtenido se le añadieron 110 µl de isopropanol y se centrifugó de nuevo 15 minutos en las condiciones ya descritas. El precipitado se secó y se resuspendió en 25 µl de TE.

6.3. Extracción de ADN plasmídico para secuenciación

Se usó un kit comercial llamado High Pure Plasmid Isolation Kit suministrado por Roche Diagnostics GmbH. Alternativamente, también se usó el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, de Sigma-Aldrich Co.

6.4. Extracción de ADN genómico

Se recogen las células de un cultivo de 5 ml en fase exponencial y se resuspenden en 0,4 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,2%). Se añaden 4 µl de una solución concentrada de RNasa (10 mg/ml), y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se añaden 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba 2 horas a 65°C. Finalmente se hacen unas 3 ó 4 extracciones con fenol:cloroformo-isoamílico en proporción 2:1, es decir, dos partes de fenol por una parte de la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1); opcionalmente se puede realizar una extracción adicional con cloroformo-isoamílico. Por último, se precipita a -20°C añadiendo 1/10 volumen de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Una vez

precipitado, el ADN genómico se lava un par de veces con etanol al 70% y se resuspende en 20 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,6).

6.5. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó siguiendo uno de los siguientes métodos:

a) Método basado en el Trizol

Este método es una modificación del protocolo de extracción con Trizol® Reagent suministrado por Invitrogen Life Technology.

Se recogen las células de 2-10 ml de cultivos saturados en tubos enfriados en N₂ líquido, y se les añade 1,4 ml de Trizol® Reagent. Se agita en el vórtex y se incuba durante 10 minutos a 60°C agitando en vórtex periódicamente. A continuación se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm y se recupera el sobrenadante. Posteriormente se añaden 0,2 ml de cloroformo, se agita en el vórtex, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 10 minutos en una microcentrífuga a 9000 rpm. Se toma el sobrenadante (unos 0,84 ml) y se le añaden 0,66 ml de isopropanol. Los tubos se incuban a -20°C durante 15 minutos y se vuelven a centrifugar 15 minutos a 9000 rpm. Se recoge el sedimento y se lava con etanol al 70%. A continuación se deja secar (a temperatura ambiente o a 50°C) y se resuspende en 40-50 µl de agua DEPC. Dado que en este método no existe tratamiento con ADNasa, es aconsejable correr una alícuota de ARN en gel para comprobar que no existe contaminación por ADN.

b) Kit de aislamiento de ARN

Alternativamente, se usó el kit comercial SV Total RNA Isolation System, suministrado por Promega Corporation. Previo a la extracción con el kit, se realizó un tratamiento con fenol-etanol (5% de fenol y 95% de etanol v/v, pH 4,3) de 30 minutos para estabilizar el ARN y prevenir la

degradación.

6.6. Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN

Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas a las compañías Roche Diagnostics GmbH, New England Biolabs y Promega Biotec. En cada caso se siguieron las recomendaciones de los fabricantes y, cuando estuvo disponible, se empleó el tampón de restricción suministrado por la casa comercial. Para las digestiones múltiples se empleó el tampón "One-phor-all" (Amersham Biosciences).

Para convertir extremos cohesivos en romos se empleó ADN polimerasa Klenow (Roche Diagnostics) si se trataba de extensiones en 5' y ADN polimerasa de T4 (Roche Diagnostics) si eran extensiones en 3'. Se añadió al ADN, bien directamente tras una digestión bien resuspendido en agua desionizada, 1 µl de dNTPs 0,5 mM y 2 U de Polimerasa de Klenow por cada 50 µl. Se incubó la reacción a 30°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción calentando a 75°C durante 10 minutos, o bien añadiendo un volumen de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico en proporción (1:1), [es decir, una parte de fenol por una parte de la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1)] agitando enérgicamente y separando las dos fases centrifugando a 15000 g durante 5 minutos.

Para la defosforilación de plásmidos se empleó fosfatasa CIP (Calf Intestine Phosphatase, Roche). Se mezclaron 1-20 pg de ADN cortado y 1 U de CIP en el tampón de la fosfatasa alcalina y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción calentando a 75°C durante 10 minutos, o bien añadiendo un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), agitando enérgicamente y separando las dos fases por centrifugación a 15000 g durante 5 minutos.

Para ligar se usó una unidad de polinucleótido ligasa de T4 (Roche Diagnostics). Habitualmente la mezcla se incubó un mínimo de 12 horas a 16°C.

6.7. Electroforesis convencional de ADN en agarosa

La electroforesis convencional en un gel de agarosa sumergido en tampón se empleó para comprobar la eficiencia de las extracciones de ADN, determinar el perfil de fragmentos tras la digestión de plásmidos, estimar la eficacia de la digestión con una endonucleasa, etc. Normalmente se empleó tampón TAE (tris-acético 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7,7).

La agarosa empleada fue de baja electroendósmosis (SeaKem, FMC, Rockland, Maine) y su concentración varió dependiendo de la gama de tamaños de los fragmentos que se pretendía separar (0,6–2%). El tampón de carga utilizado fue de un *stock* 5 x (azul de bromofenol al 0,125%, Ficoll 400 al 12,5%).

Como patrón de peso molecular se empleó ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind*III o la escalera de 1 kb (GIBCO, BRL, Life Technologies, Nueva York). Las muestras se mezclaron con 1/6 volumen de tampón de carga. En las hibridaciones Southern, se usó como patrón el indicador III marcado con digoxigenina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania), que es equivalente al ADN del bacteriófago λ digerido simultáneamente con *Eco*RI y *Hind*III.

Para hacer visible el patrón de bandas, los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio (5 μ g/ml). Alternativamente, se añadió bromuro de etidio al gel, a una concentración final de 0,5 μ g/ml. Los geles se iluminaron con un transluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron empleando una película instantánea Polaroid ISO 3000/36 (Polaroid Corporation, Cambridge, Massachusetts). Alternativamente, los geles se registraron con un analizador de imagen (ImageStore 5000, Ultra Violet Products).

6.8. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Se usó el kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit suministrado por Amersham Biosciences. Alternativamente, también se usó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System,

suministrado por Promega Corporation.

7. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO POR HIBRIDACIÓN

7.1. Transferencia de fragmentos de ADN separados por electroforesis a filtros de nailon

Tras la electroforesis en agarosa, los geles fueron tratados mediante el procedimiento de Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.* 1989), con despurinización, desnaturalización y neutralización. Para la transferencia del ADN desde geles convencionales se empleó un sistema de vacío (TransVac TE80, Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, California). Tras la transferencia, los filtros se lavaron en SSC 6x y se fijaron en un *cross-linker* por irradiación con luz ultravioleta (700 J/m^2) por ambos lados. Posteriormente se enjuagaron con agua bidestilada.

7.2. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina-dUTP

Se empleó el marcaje no radiactivo con digoxigenina-dUTP (desoxiuridín trinucleótido fosfato) de Boehringer Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante. El marcado se realizó con el sistema de la mezcla de cebadores aleatorios.

7.3. Hibridación ADN-ADN

Los filtros de nailon se prehibridaron un mínimo de 1 hora a 42°C , empleando formamida al 50% en la solución de prehibridación e hibridación, y usando el tampón de bloqueo suministrado en el lote de Boehringer Mannheim. La hibridación se llevó a cabo durante 14 horas a 42°C . A continuación se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno con SSC 2x y SDS 0,1% a temperatura ambiente, y otros dos de 15 minutos

cada uno con SSC 0,1x y SDS 0,1% a 68°C.

7.4. Deshibridación de filtros de nailon

Cuando fue necesario deshibridar algún filtro para poder rehibridarlo con una sonda diferente de la utilizada en primer lugar, el filtro se lavó dos veces durante 15 minutos a 85°C con una solución de EDTA 50 mM pH 8 y SSC 2x. A continuación, el filtro se lavó dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS 0,1%. Posteriormente se lavó dos veces con SDS 0,1% y NaOH 0,2 N durante 15 minutos a 37°C. Finalmente el filtro se enjuagó con SSC 2x. La nueva hibridación debe comenzar en el paso de la prehibridación. En algún caso, el filtro se lavó con agua bidestilada y se incubó en una solución de NaOH 0,2 M y SDS 0,1% a 37°C durante 10 minutos; posteriormente el filtro se lavó con SSC 2x y se prehibridó, como primer paso de la nueva hibridación.

7.5. Detección de secuencias por hibridación con sondas no radiactivas

La detección se basa en el reconocimiento de la digoxigenina por un anticuerpo que está conjugado con la fosfatasa alcalina. Tras incubar el filtro con el anticuerpo y lavar el anticuerpo sobrante, la reacción de la fosfatasa se pone de manifiesto con CSPD (Boehringer Mannheim, Alemania), que es un sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina. Posteriormente, el filtro se utiliza para impresionar una película de rayos X durante el tiempo necesario (desde 5 minutos a 12 h) a temperatura ambiente.

7.6. Marcado de oligonucleótidos con [γ -P³²]-ATP

Para el marcaje terminal de oligonucleótidos con [γ -P³²]-ATP, se usó la enzima T4 polinucleótido quinasa suministrada por Roche Diagnostics

GmbH. Se mezclaron 10 pmoles de oligonucleótido con 1 µl de tampón, 2 µl de [γ -P³²]-ATP (3000 ci/nmol) y 5 U de T4 Polinucleotide Kinase en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó durante 1h a 37°C, se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se filtró por una columna de SephadexTM G-50 suministrado por Amersham Biosciences. Posteriormente se cuantificó la radiactividad incorporada mediante el uso de un contador de centelleo (Wallac 1409 DSA Liquid Scintillation Counter, CPM mode).

8. SECUENCIACIÓN

8.1. Cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación fueron sintetizados por Invitrogen Life Technology (Prat de Llobregat, Barcelona). Los oligonucleótidos usados fueron T3 y T7 para las reacciones de secuenciación de fragmentos de ADN clonados en pBluescript SKII+. Para la secuenciación de regiones específicas se diseñaron cebadores basados en secuencias conocidas. La lista de los cebadores usados en esta tesis se muestra en la **Tabla M4**.

Tabla M4. Relación de oligonucleótidos usados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')
flhA5'	GTTACACCCATACCGCTATC
flhA3'	CAGTTATATGCTGCCGTTGC
flhA-P1	AACCGTCAGGGGAAAGAGCAACAACGCCAGCCATTTACGCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC
flhA-P2	GTGCCAGAAGCGCTGGATTTTATGAACGAG
igaA5'	GCGTGTATACCGATGCCAAC
igaA3'	CTCCAGGGTAACGCAATTTG

igaA-P1	TCAGATGAGATTTTCCGGAGAGACGGTTAACCTGGGATGTGTAGGCTGGAGCTGC TTC
igaA-P4	CGTTTTTGTACCGTGGATGATAGGCGGCGGATCCTGCTGATTCCGGGGATCCGT CGACC
igaApro5'	GTCAGAATTCCAGCGTACCTGCGGCAATGG
igaApro3'	CGTAGGATCCAGAGAGCAGGCCAGCAAAGC
igaA-STOP	CAGCTTTCATAGTATTCCTGG
Kan1	AGCTGTGCTCGACGTTGTCA
LacZ	GACCATTTTCAATCCGCA
MuL	CGAATAATCCAATGTCTCTCC
MuLi	ATTGCACTACAGGTTGCAAG
rcsA5'	CGTGTTCCGTCTGATTATGG
rcsA3'	CTTCAATGAGTCAGGTCAC
rcsA-P1	CAATTCGGCCCTGCGCTTTCAACCACTCGCGTACCAGAAAGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC
rcsA-P2	GAGGTACATTGCCAGTCCGGATGTCTCAGCGCATGTTAACCATATGAATATCCTC CTTAG
rcsB5'	AGCGGAATTCAGGAGGAATACATGAACAATATGAACG
rcsB3'	GTGAAAGCTTGTCGACAAGCGATTTATTCTTTGTCTG
rcsB-P1	ATTATTGCCGATGACCACCCGATTGTACTGTTCGGTATTCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC
rcsB-P2	AGAGAGATAGTTGAGCAGCGGATATCATTCTCTACGCCCCATATGAATATCCTC CTTAG
rcsC5'	GTAATGTTATTGCTGTGCGAG
rcsC3'	TATGTTACCCAGCCTGATGG
rcsC(1)	CATGAGCGGATTATGAAATAC
rcsC(2)	TGAGTAACGAACTGGCGCAC
rcsC(3)	CTGTTGAGCAACGCCATTAAG
rcsCSec	GATTCCGTTGGAAAGAGC
srfA-P1Flag	CCACGCGGCAATTCCGTTGACGTTTAAAAAGATAGGTGCCGACTACAAAGACCAT GACGG
srfA-P2Flag	GACGCTCTGTTTGTAATCACACAGATTGACCAACATAAAACATATGAATATCCTC CTTAG
srfB-P1Flag	CAGCCACTACTGGATAGATAGTGGGAGTGTATACCTGAAAGACTACAAAGACCAT GACGG
srfB-P2Flag	CCCCTCGATAACAGCCTGGGTGGTGTTTAACGGTTTTGCATATGAATATCCTCC TTAG
srfC-E1	GCGTCTAACAAAGCTTGACG

srfC-E2	GTCATGGCGGTGATATCATC
srfC-P1Flag	CCGACGTAGACAGAGCGCAATTAATTGCCCTGATAGCCGACTACAAAGACCATGA CGG
srfC-P2Flag	GATAAGTTTCCCCGTCGCATTGCTGTTTTCGCTTTTCTGACATATGAATATCCTC CTTAG
ssaV5'	CGAGCTCTGGTTACGATTAC
ssaV3'	CAGCCTCAGACGTTGCATC
ssaV-P1	CATCATCGACAAATAAAATTTCTGGAGTCGCAATGCGTTCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC
ssaV-P2	CAATTCATTCTTCATTGTCCGCCAACTCCTCTTCGCTAAGCATATGAATATCCTC CTTAG
ssrB5'	CGATGATGAGCAATACTGCG
ssrB3'	GAGGAACTAACCGACTTACG
ssrB-P1	AATATGACCAATGCTTAATACCATCGGACGCCCTGGTTAGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC
ssrB-P2	TACTTAATATTATCTTAATTTTCGCGAGGGCAGCAAATGCATATGAATATCCTC CTTAG
T3	AATTAACCCCTCACTAAAG
T7	TAATACGACTCTATAGGG
Tn10d5'	CTTTCTAAGGCAGACCAACC
Tn10d3'	CACGCACAACAGATTTTACG
yrfG5'	GTTTCCGGTACCAGCTTTTG
yrfH5'	GTAAGGGTTGCGTTCAGCTC
yrfI5'	GAGCTGTACCGTAATGTCAC

8.2. Secuenciación

El ADN plasmídico o el ADN cromosómico amplificado por PCR fue secuenciado en el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Paterna).

8.3. Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de secuencias de nucleótidos se realizó empleando los programas Gapped BLAST de NCBI y Clustal W 1.60.

9. CARACTERIZACIÓN DE LAS INSERCIONES DE *MudJ* o *Tn10dTc*

Para la caracterización de las inserciones se llevaron a cabo dos estrategias distintas.

9.1. Restricción, clonación y transformación

Se realizaron digestiones simples del ADN genómico con distintas enzimas, como *Bam*HI, *Pst*I o *Sal*I. A la vez, se cortó el vector pBluescriptIISK(+) con las mismas enzimas. Las restricciones del ADN genómico se purificaron mediante fenolización, para inactivar la enzima, y seguidamente se precipitó el ADN con acetato sódico 0,3 M y etanol absoluto. El vector se purificó mediante pase por gel de agarosa y purificación de bandas mediante un kit comercial. Tras esto, se ligaron los fragmentos así cortados con el vector, en relación de 1:1 o 9:1 inserto:vector. Se dejó toda la noche a 15°C, y se transformó la estirpe DH5 α . Se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes obtenidos y se mandaron a secuenciar con los oligonucleótidos MuLi, o Tn10d5' y Tn10d3', según correspondiese en cada caso. Este método tiene una limitación, basada en el tamaño de los fragmentos generados en la restricción. Si estos fragmentos son muy grandes, es muy difícil conseguir clonarlos.

9.2. PCR inversa

Esta estrategia sólo se usó para caracterizar las inserciones *MudJ* que no se pudieron clonar con el método anterior. Se realizaron digestiones dobles de ADN genómico con enzimas de restricción que

cortan, por un lado, en un extremo de *MudJ*, y por el otro, en el ADN genómico de la bacteria. Así se obtiene una única banda cuyo tamaño fue determinado por hibridaciones Southern (**apartado 7**), usando una sonda contra el gen de resistencia a kanamicina de *MudJ*. Se seleccionaron aquellas digestiones que generaran bandas de hibridación entre 2 y 3 kb para someterlas a PCR inversa.

La PCR inversa nos permite amplificar una secuencia específica de ADN genómico conociendo sólo un extremo de la misma. Las digestiones dobles con las enzimas seleccionadas dejan sólo un extremo del *MudJ* que lleva la resistencia a kanamicina y un fragmento de ADN genómico desconocido (**Figura M2**).

Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos: un par en la resistencia a kanamicina (Kan1 y Kan2), y otro en el extremo *attL* de *MudJ* (MuL y MuLi), orientados en direcciones opuestas (**Tabla M4**). Se hicieron digestiones dobles *SmaI/SspI* y *SmaI/EcoRV* de 500 ng de ADN genómico de *Salmonella*. *SmaI* corta en el extremo de *MudJ* cercano al *attL* y *SspI* o *EcoRV* cortarían fuera del trasposón, en sitios no conocidos del ADN de la bacteria y cuyos extremos generados son compatibles. Se pueden hacer digestiones simples cortando con enzimas que corten una sola vez en el trasposón, pero en este caso las digestiones dobles eran más aconsejables para conseguir fragmentos más pequeños y poder amplificarlos fácilmente por PCR.

Una vez inactivadas las digestiones durante 10 minutos a 65°C, los fragmentos de ADN digeridos se ligaron con ligasa T4 toda la noche a 15°C y se utilizaron como molde para dos amplificaciones consecutivas con los oligonucleótidos correspondientes en cada caso (McPherson y Møller 2000) (**Figura M2**). La primera amplificación se realizó con los oligonucleótidos internos Kan1 y MuLi. Visualizamos las bandas obtenidas en la PCR1 mediante electroforesis en gel de agarosa, y en los casos en los que observamos el tamaño esperado, cortamos la banda y la purificamos mediante kit. El producto purificado se clonó directamente en el vector de clonación pGEM®-T easy, para secuenciarlo posteriormente con los oligonucleótidos T3 y T7, o con MuL (**Tabla M4**).

En los casos en los que se obtuvieron productos no específicos en la PCR1, utilizamos el producto de la misma como molde para una segunda ronda de amplificación con los oligonucleótidos externos Kan2 y MuL. En esta segunda ronda de PCR la probabilidad de éxito es mayor ya que el ADN molde se ha enriquecido con la PCR1. Se obtuvieron las bandas correspondientes al tamaño esperado y el producto final se purificó y clonó en el mismo vector, para secuenciarlo posteriormente con los oligonucleótidos T3 y T7. La reacción de PCR en ambos casos fue: 95°C-3 minutos, (95°C-30 s / 56°C-30 s / 72°C-3 minutos) (35 ciclos), 72°C-5 minutos.

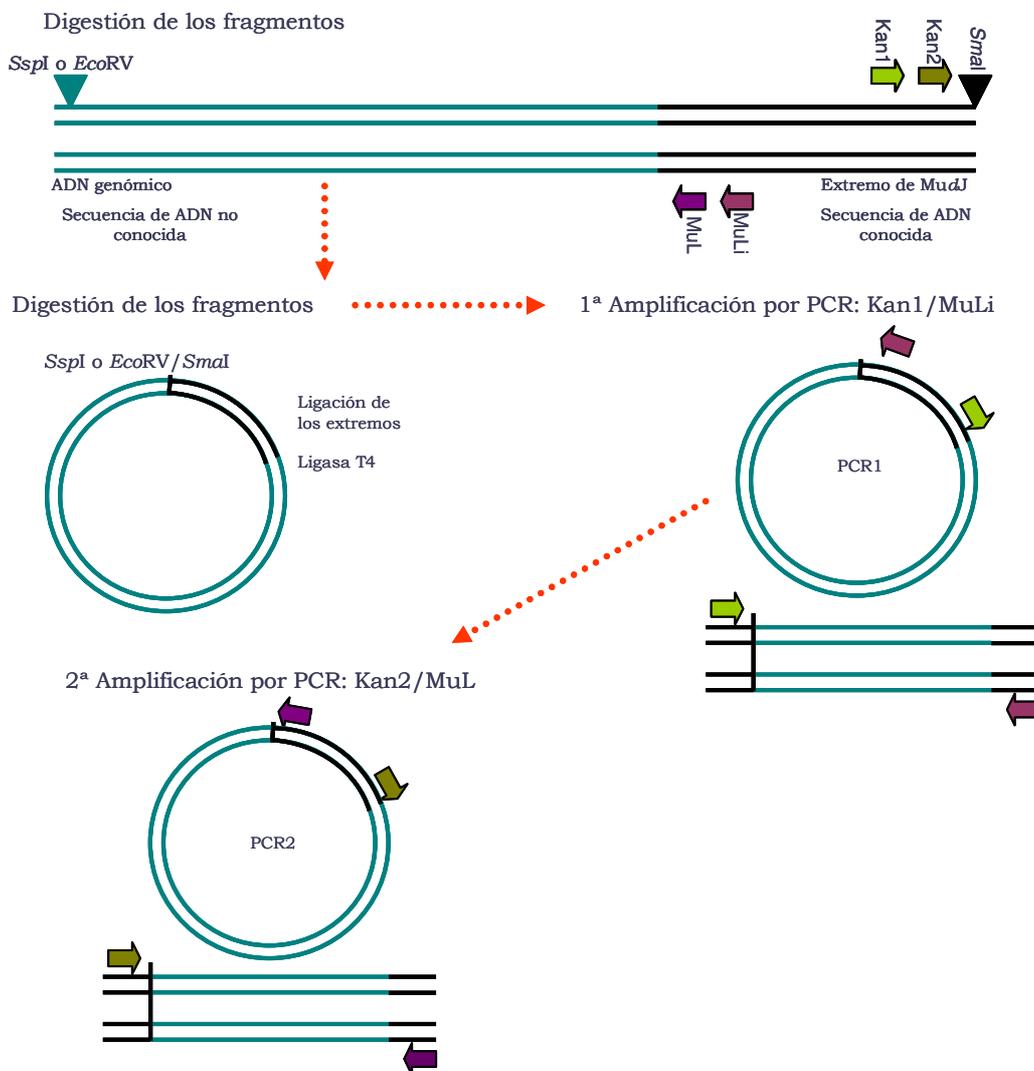


Figura M2. Caracterización de las inserciones MudJ por PCR inversa.

10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En las reacciones de amplificación se usó un termociclador de ADN Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, California), y se utilizó según las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones de PCR se realizaron con 1 ng de ADN, dNTPs 100 μ M cada uno, cebadores 1 μ M, 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, y una concentración final de $MgCl_2$ de 1 mM en un volumen de 100 μ l. Según la finalidad de la PCR se usaron dos tipos de polimerasa *Taq*: Taq Expand™ High Fidelity PCR System, suministrada por Roche Diagnostics, y EcoTaq, suministrada por Ecogen, S.R.L.

Para la comprobación de algunos clones se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir de colonias. En estos casos se preparó una mezcla con dNTPs 100 μ M cada uno, cebadores 0,2 μ M, 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, y una concentración final de $MgCl_2$ de 1 mM en un volumen de 25 μ l. En esta mezcla se resuspende una colonia.

Antes de usar los productos de PCR se limpiaron de proteína, oligonucleótidos y dNTPs, mediante un kit comercial de purificación de bandas (**apartado 6**).

11. EXTENSIÓN DE UN CEBADOR MEDIANTE TRANSCRIPTASA INVERSA

Para los experimentos de extensión de un cebador mediante transcriptasa inversa (“reverse primer extension”) se siguió el método descrito por Manzanera y colaboradores (Manzanera *et al.* 2001). Se mezcló 1 μ l de oligonucleótido (0,5 nM), marcado en su extremo con ^{32}P ,

con al menos 10 µg de ARN total en 10 µl de tampón de hibridación (PIPES 10 mM, NaCl 0,4 M). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 85°C. Transcurrido este tiempo, se pasó a un baño a 65°C y se dejó bajar la temperatura hasta 42°C. Entonces se añadieron 40 µl de la mezcla de extensión, que contiene 7 unidades de Transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase, AMV, suministrada por Roche Diagnostics GmbH), dNTPs (12,5 µM cada uno) y una unidad de inhibidor de RNasa (RNase inhibitor, suministrado por Roche Diagnostics GmbH) en el tampón suministrado con la transcriptasa inversa. La mezcla se incubó a 42°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo, las muestras se precipitaron a -20°C añadiendo 5 µl de acetato sódico 3 M y 150 µl de etanol absoluto, se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en Tampón STOP (95% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de cianol de xileno) diluido 1/2 en Tris-HCl 10 mM. Antes de ser usadas, las muestras se desnaturalizaron mediante incubación durante 5 minutos a 80°C. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida desnaturalizante de 50 cm de longitud y 0,4 mm de grosor, preparado con el sistema “Gel System Sequi-Gen Sequencing gel” suministrado por BIO-RAD. La composición del gel es 6% de acrilamida:bisacrilamida (19:1), urea 7 M y TBE 1x. Tras preparar la mezcla del gel, ésta se filtra y se añaden a los 50 ml, 500 µl de APS 10% (persulfato de amonio) y 50 µl de TEMED (N, N, N', N' tetrametiletildiamida). Una vez extendido el gel de secuenciación, se deja polimerizar al menos una hora y se hace una pre-carrera en tampón TBE 0,5x durante una hora a 50 W. Transcurrido este tiempo, se cargan la muestras desnaturalizadas y se someten a electroforesis a 2000 V durante el tiempo necesario. El gel se secó en un secador “DryGel Sr, Slab Gel Dryer Model SE1160” (Hoeffer Scientific Instruments). La exposición se hace en película de rayos X, con pantalla amplificadora (Hyperscreen™ de Amersham Biosciences), o bien se analiza con un Fujifilm FLA-3000 Betascope.

12. INACTIVACIÓN DE GENES CROMOSÓMICOS USANDO PRODUCTOS DE PCR

Para la construcción de mutantes nulos se siguió el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner 2000). Este procedimiento está basado en el sistema de recombinación Red del fago λ . Una de las razones por las que *E. coli* o *Salmonella* no son transformables con ADN lineal es la presencia de exonucleasas intracelulares que lo degradan. El sistema Red del fago λ incluye los genes γ , β y *exo* que especifican las proteínas Gam, Bet y Exo, respectivamente. Gam inhibe la exonucleasa V del hospedador permitiendo el acceso de Bet y Exo a los extremos de ADN para promover la recombinación. La estrategia básica consiste en reemplazar una secuencia cromosómica (por ejemplo el gen B en la **Figura M3**) por un gen de resistencia a antibiótico seleccionable, que es generado por PCR usando cebadores que contienen 40 nucleótidos de homología con la secuencia que queremos reemplazar (P1 y P2 en la **Figura M3**). La recombinación la lleva a cabo el sistema Red del fago λ , expresado desde un promotor inducible en un plásmido de bajo número de copias y termosensible (pKD46). Tras la selección, el gen de resistencia puede eliminarse usando otro plásmido (pCP20) que expresa la recombinasa FLP del plásmido de 2μ de *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema FLP actúa en las repeticiones directas FRT (“FLP recognition target”) que flanquean la secuencia (**Figura M3**). Los plásmidos que contienen los sistemas Red y FLP son termosensibles y pueden curarse fácilmente mediante crecimiento a 37°C.

Paso 1: Amplificación por PCR del gen de resistencia a antibiótico flanqueado por las secuencias FRT



Paso 2: Transformación de la estirpe que expresa la recombinasa Red



Paso 3: Selección de los transformantes resistentes a antibióticos



Paso 4: Eliminación del gen de resistencia usando el sistema FLP



Figura M3: Representación esquemática del sistema de inactivación de genes mediante productos de PCR. H1 y H2 indican las regiones de homología con la secuencia a deletar. P1 y P2 son las regiones de homología de las secuencias que flanquean el gen de resistencia a antibiótico. Figura adaptada de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner 2000).

12.1. Preparación del ADN para la sustitución

Los plásmidos usados como molde en las reacciones de PCR fueron pKD3 (Cm^r) o pKD4 (Km^r). Los oligonucleótidos cebadores tenían 40 nucleótidos de homología con el gen a inactivar y 20 nucleótidos de homología con pKD3 y pKD4. Los oligonucleótidos usados para la construcción de los distintos mutantes se relacionan en la **Tabla M4**. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a una temperatura de hibridación

de 56°C y 2 min de síntesis a 72°C usando la enzima Taq Expand™ High Fidelity PCR System, suministrada por Roche Diagnostics. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y la banda de amplificación fue purificada mediante un kit comercial.

12.2. Transformación de los receptores

Se prepararon células electrocompetentes de las estirpes receptoras adecuadas que llevaban el plásmido pKD46, que expresa el sistema λ Red bajo el control del promotor de *araB* inducible por arabinosa. Para la obtención de células electrocompetentes, inóculos cultivados a 30°C en LB con ampicilina se diluyeron 1:100 en 50 ml de SOB sin magnesio con 1 mM de arabinosa y se incubaron a 30°C en agitación hasta D.O.₆₀₀ 0,5. Las células fueron entonces recogidas por centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 20 ml de glicerol al 10% frío. Posteriormente se centrifugó de nuevo 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y el sedimento se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10% frío. Tras una nueva centrifugación se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10% frío. Las células fueron entonces centrifugadas de nuevo, y el sobrenadante se eliminó completamente usando una trampa de agua. Las células se resuspendieron en 500 μ l de glicerol al 10% frío. Alícuotas de 100 μ l de células se mezclaron con 10 μ l de ADN y se sometieron a una descarga eléctrica en el electroporador (25 μ F, 200 Ω y 2,5 kV). El electroporador empleado fue un Electroporator Manipulator 600 (BTX, San Diego). Posteriormente se añadió 1 ml de LB a la cubeta y la mezcla se transfirió a un tubo de ensayo, que se agitó a 37°C durante 1,5 horas. Tras la incubación, las células se recogieron por centrifugación y se sembró la mitad en medio selectivo. La otra mitad se dejó a temperatura ambiente y, en caso de no obtener ningún transformante resistente a antibiótico, se sembró (aproximadamente tras 16 horas de incubación a temperatura ambiente). Los transformantes resistentes a antibióticos se comprobaron mediante PCR de colonias usando cebadores externos a la región sustituida.

12.3. Escisión del gen de resistencia a antibiótico

Una vez sustituidos los genes de interés, las mutaciones fueron introducidas en los fondos genéticos apropiados mediante transducción con P22 y selección de la resistencia a antibiótico correspondiente. Posteriormente, cuando fue necesario, el gen de resistencia se escindió transduciendo el plásmido pCP20 con P22 HT. La transducción se incubó una hora a 30°C y se sembró en LB con ampicilina. Para eliminar el plásmido pCP20, las limpiezas de fagos se llevaron a cabo en placas EBU sin antibiótico incubadas a 37°C. Una vez que los candidatos estuvieron limpios de fagos, la pérdida de la resistencia a antibiótico se detectó sembrando en cajas de LB+ampicilina y LB+cloranfenicol o kanamicina (según corresponda). La escisión del "casete" de resistencia se comprobó mediante PCR con los cebadores externos.

13. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES *lac* USANDO EL SISTEMA λ Red Y RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO MEDIADA POR EL SISTEMA FLP

Para la construcción de las fusiones transcripcionales en el cromosoma se siguió el método descrito por Ellermeier y colaboradores (Ellermeier *et al.* 2002). Este método permite la construcción de fusiones *lac* estables usando el sistema de recombinación específica de sitio FLP/FRT.

Como explicamos en el apartado anterior, usando el sistema desarrollado por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner 2000) se puede insertar un "casete" de resistencia a antibiótico en cualquier punto del cromosoma bacteriano. Dado que la inserción está flanqueada por sitios

FRT, el casete de resistencia puede escindirse introduciendo el plásmido pCP20, que codifica el sistema FLP. El resultado de la delección es un único sitio FRT en el punto de inserción (**Figura M3**). Este sitio FRT puede usarse para la integración de un plásmido que contiene un sitio FRT corriente arriba de los genes *lacZY*, generando así una fusión transcripcional. La recombinación específica de sitio mediada por el sistema FLP es un evento direccional.

Ellermeier y colaboradores han construido dos plásmidos para la creación de fusiones transcripcionales *lac* que difieren en la orientación del sitio FRT: pCE36 y pCE37, y un plásmido para la creación de fusiones traduccionales *lac*, pCE40, que tiene codones de STOP en todos los marcos de lectura, excepto en uno de ellos. Estos plásmidos contienen además un gen de resistencia a kanamicina y el origen de replicación R6K, que únicamente funciona cuando se proporciona proteína π en *trans*. La elección del plásmido depende de la orientación del sitio FRT en la mutación original.

La **Figura M4** muestra una representación esquemática de la construcción de una fusión *lacZ*. Mediante el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner 2000), generamos una sustitución del gen de interés por el “casete” de resistencia a cloranfenicol. Posteriormente, este “casete” es escindido mediante la introducción del plásmido pCP20, que expresa el sistema de recombinación específica de sitio FLP. La escisión genera una “cicatriz” en el punto de inserción que consiste en un único sitio FRT con una determinada orientación. La integración del plásmido pCE correspondiente en la cicatriz genera una fusión *lacZ*.

Amplificación del gen de resistencia flanqueado por las secuencias FRT



Transformación de la cepa que expresa el sistema de recombinación λ Red



Selección de los transformantes resistentes a antibiótico



Eliminación del casete de resistencia usando un plásmido que expresa el sistema FLP



Transformación con el plásmido que construye la fusión *lacZ* e integración usando el sistema FLP. Selección de los transformantes resistentes a kanamicina

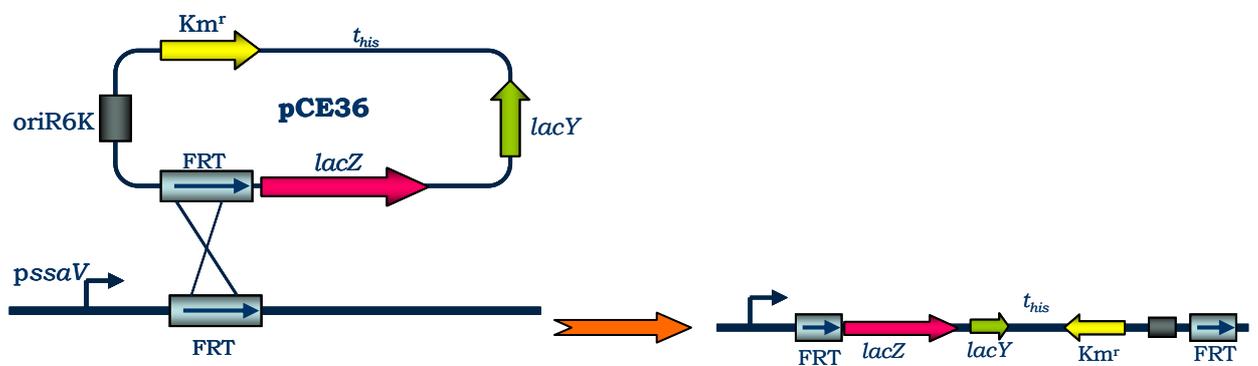


Figura M4. Esquema de la construcción de las fusiones transcripcionales *lac* en el cromosoma.

14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Los análisis de β -galactosidasa se hicieron mediante el método de Miller (Miller 1972) modificado por Maloy (Maloy 1990), usando CHCl_3 -SDS para permeabilizar las células. Las estirpes a ensayar se cultivaron en las condiciones en las que se quería medir la expresión. Tras el crecimiento, se mezclaron 700 μl de tampón Z con 100 μl de células, 30 μl de cloroformo y 15 μl de SDS al 0,1%. La composición del tampón Z es la siguiente: 16,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g de KCl; 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y agua destilada hasta completar 1 l. Antes de usar el tampón se le añaden 2,7 ml de β -mercaptoetanol por litro. La mezcla de células, tampón, cloroformo y SDS se agitó en el vórtex y se incubó durante 5 minutos a 30°C. Se añadieron 200 μl de una solución de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) [4 mg/ml], se agitó en el vórtex y se incubó a 30°C hasta que la mezcla de reacción se volvió amarilla. Se añadieron entonces 500 μl de una solución de Na_2CO_3 1 M para detener la reacción. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos en una microcentrífuga y se midió la absorbencia a 420 nm y 550 nm. La actividad β -galactosidasa se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad (UM)} = \frac{A_{420} - 1,7 \times A_{550}}{V \times \text{D.O.}_{600} \times t} \times 1.000$$

A_{420} = Absorbencia de la reacción a $\lambda = 420$ nm

A_{550} = Absorbencia de la reacción a $\lambda = 550$ nm

V= volumen de cultivo en la reacción (ml)

D.O.₆₀₀ = Densidad óptica del cultivo a $\lambda = 600$ nm

t= tiempo de reacción (minutos)

Para los ensayos β -galactosidasa de fusiones cuya actividad es menor de 50 unidades Miller, los inóculos fueron previamente concentrados mediante centrifugación y posterior resuspensión en un volumen menor. En este caso, la D.O.₆₀₀ se midió diluyendo el inóculo previamente concentrado.

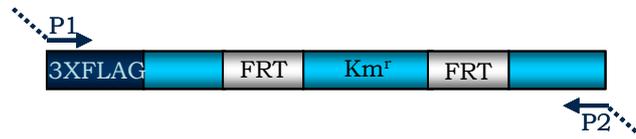
15. CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON EL EPITOPO 3xFLAG

Para etiquetar proteínas con el epitopo 3xFLAG, se siguió el método empleado por Uzzau y colaboradores (Uzzau *et al.* 2001). Se trata de una modificación del método de Datsenko y Wanner, explicado anteriormente (**apartado 12**). La estrategia básica consiste en manipular una secuencia cromosómica, la secuencia final del gen que codifica la proteína que queremos etiquetar, añadiéndole un fragmento de ADN que contiene una secuencia que especifica un epitopo (3XFLAG) y una resistencia a antibiótico (Km). Dicha construcción es generada por PCR, y se representa en la **Figura M5**.

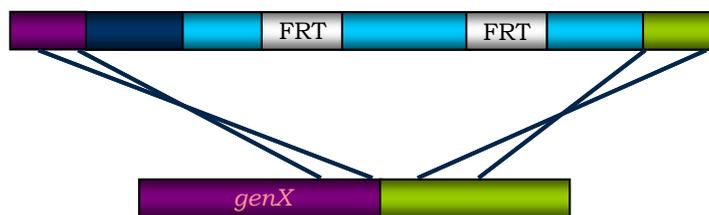
Para la amplificación usamos una pareja de oligonucleótidos que contienen 40 nucleótidos de homología con la secuencia final del gen que queremos etiquetar por un lado (P1), y por el otro 40 nucleótidos con la secuencia a continuación de ésta (P2). El plásmido que usamos como molde se llama pSUB11 (**Tabla M2**) que contiene la secuencia del epitopo FLAG repetida 3 veces. Sometemos el producto de la PCR a una electroforesis y cortamos la banda resultante para purificarla posteriormente con un kit comercial. Utilizamos el fragmento amplificado y purificado para electroporar la estirpe silvestre con el plásmido pKD46. Las electrocompetentes se hicieron usando el mismo protocolo que en el método de Datsenko y Wanner (**apartado 12**). La electroporación se sembró en medio LB suplementado con kanamicina. La correcta

incorporación del fragmento amplificado se comprobó por PCR con otra pareja de oligonucleótidos externos, o por hibridación western.

1. Amplificación por PCR del epítopo 3XFLAG y el gen de resistencia



2. Transformación de la estirpe que expresa el sistema de recombinación λ Red



3. Comprobación de la correcta proteína de fusión por western

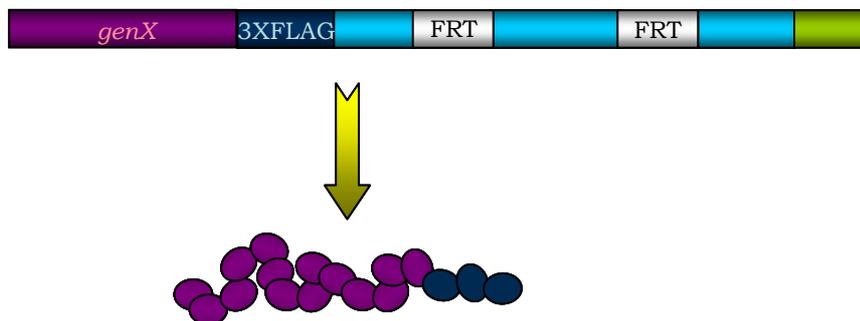


Figura M5. Construcción de proteínas de fusión con el epítopo 3XFLAG.

16. PREPARACIÓN DE GELES Y CONDICIONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separan por su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido por SDS-PAGE (de electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS) descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Las muestras, en un sistema vertical Mini Protean[®] III

(BioRad) se empaquetan primero en un gel de empaquetamiento de 1 cm de longitud, para separarse a continuación en el gel de separación de unos 5 cm de longitud. Se usaron geles al 10% de acrilamida/bisacrilamida con un gel de empaquetamiento al 4%. La electroforesis en los equipos Mini Protean® III se realiza aplicando un campo eléctrico de unos 175 V de 45 a 60 minutos.

Las muestras se mantienen en hielo en todo momento y antes de someterlas a la electroforesis se les añade tampón de carga hasta una concentración 1x, se hierven durante 5 minutos y se centrifugan a 15000 g durante varios segundos. El sobrenadante se carga en el gel de electroforesis. Como patrón de peso molecular se utiliza un marcador comercial (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range o Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, BioRad Laboratorios).

Gel de Empaquetamiento: Tris-HCl 125 mM a pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida al 40% (SOLU GEL 29:1 ULTRA PURA, PRONADISA), TEMED 0,1% (v/v), persulfato amónico 0,05% (p/v).

Gel de Separación: Tris-HCl 375 mM a pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida al 40% (SOLU GEL 29:1 ULTRA PURA, PRONADISA), TEMED 0,05% (v/v), persulfato amónico 0,05% (p/v).

Tampón de migración 10X: Glicina 144,1 g/l, SDS 10 g/l y Tris 30,3 g/l. Ajustar el pH a 8,8.

Tampón de Laemmli para la muestra (SB 4X): Azul de bromofenol 0,000125%, Tris-HCl pH 6,8 200 mM, β -mercaptoetanol 20%, glicerol 40% y SDS 8%.

16.1. Tinción de geles con azul de Coomasie

Para teñir un gel proveniente de SDS-PAGE se utiliza el colorante Brilliant Blue R-250 (Sigma). Para ello, se baña el gel en la solución de tinción durante 30 minutos. A continuación, se retira dicha solución y se añade solución de destinción, manteniéndose hasta que las bandas correspondientes a las proteínas se visualizan claramente.

Para conservar el gel una vez desteñado, se lava con agua destilada y se introduce entre dos fragmentos de celofán previamente empapados en agua. A continuación se eliminan todas las burbujas. Después se puede someter a vacío a 70°C sobre un papel Whatman® 3MM, o bien se puede dejar secar sobre una superficie plana a la que se sujetan los extremos del papel celofán mediante pinzas.

Solución de Tinción: 0,25% (p/v) Brilliant Blue R-250 (Sigma), 7% (v/v) ácido acético y 45% (v/v) de metanol.

Solución de Destinción: 10% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) metanol.

17. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR HIBRIDACIONES WESTERN

Para la inmunodetección de proteínas mediante hibridación Western, es necesario, en primer lugar, separar las muestras de proteínas (hervidas en el tampón de la muestra 2x) mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (porcentaje de acrilamida 7,5%-15%) aplicando 175 V.

Se sustituye el tampón de migración por el tampón de transferencia. Se moja todo lo necesario para la transferencia (esponjas, papel Whatman 3MM, membrana de nitrocelulosa (Hybond™ECL™) y gel de poliacrilamida) en tampón de transferencia.

Utilizamos un sistema de transferencia húmeda (Trans-Blot cell, Biorad) y realizamos la transferencia a 80 V, 1,5 h. Para evitar un aumento excesivo de temperatura introducimos la cubeta dentro de un recipiente con hielo.

Una vez terminada la transferencia, lavamos la membrana 2 veces con agua destilada. Teñimos con Rojo Ponceau (0,5% p/v en 1% de ácido acético) durante 5 minutos y posteriormente lavamos con agua destilada hasta la aparición de bandas. Bloqueamos durante 1 h con leche en

polvo al 5% en TBS-Tween 0,1% y azida sódica 0,2% a temperatura ambiente, para evitar que el anticuerpo se una de forma inespecífica.

Añadimos el anticuerpo primario diluido adecuadamente en TBS-Tween 0,1%, leche en polvo y azida sódica. Incubamos 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. En nuestro caso, el anticuerpo primario utilizado fue anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el epitopo FLAG (anti-FLAG M2 F3165-1MG, Sigma-Aldrich Química S.A.).

A continuación realizamos 3 lavados con TBS-Tween de 10 minutos cada uno y, posteriormente añadimos el anticuerpo secundario e incubamos durante 1 h. El anticuerpo secundario que usamos fue un anticuerpo de cabra anti-IgG/HRP de ratón (BioRad Laboratorios S.A.). Lavamos nuevamente con TBS-Tween, 6 lavados de 5 minutos cada uno.

Finalmente, realizamos la reacción de detección en la que usamos SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Biotechnology, Inc), que es un sustrato muy sensible para detectar la peroxidasa de rábano (HRP) en inmunodetecciones.

Tampón de transferencia 4x: Tris base 12,1 g/l, glicina 57,6 g/l. El tampón de transferencia 1x lleva además 20% de metanol y 0,04% de SDS.

TBS-Tween 10x: Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g, Tween-20 10 ml. Ajustar el pH final a 7,6.

18. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS.

Para purificar proteínas secretadas usamos una modificación de los protocolos descritos anteriormente (Bensadoun y Weinstein 1976, Hansen-Wester *et al.* 2002). Preparamos inóculos de 20 ml en las condiciones adecuadas, según las proteínas que quisiéramos estudiar. Se centrifugan a 4500 rpm durante 20 minutos. Tomamos 3,5 ml del sobrenadante y lo filtramos usando una jeringa de 5 ml y filtros de 0,22

µm de tamaño de poro (Millipore). Con esto se consigue eliminar los restos celulares y de bacterias completas que hayan quedado tras la centrifugación.

El sedimento se resuspende en 5 ml de PBS1x. Se toman 50 µl y se centrifuga a 13000 rpm durante 2 minutos. Se elimina el sobrenadante, y el sedimento se resuspende en 50 µl de tampón de Laemmli. Hervimos 5 minutos y cargamos en un gel de poliacrilamida (**apartado 16**).

El sobrenadante filtrado es sometido a precipitación de proteínas. Para ello, se añade desoxicolato sódico al 0,02%, y se incuba 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo se añade ácido tricloroacético al 10%. Se incuba 5 minutos a -20°C y posteriormente 15 minutos en hielo. Centrifugamos 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Eliminamos el sobrenadante. Se añaden 300 µl de acetona fría. Incubamos 15 minutos en hielo. Se vuelve a centrifugar 10 minutos a 4°C a 13000 rpm. Eliminamos el sobrenadante, y dejamos secar el sedimento. Una vez seco, se añade 20 µl de tampón de Laemmli. Se hierve 5 minutos, y se carga en un gel de poliacrilamida (**apartado 16**).

RESULTADOS

Capítulo 1

Contribución del sistema Rcs a la virulencia de *Salmonella*

Experimentos previos habían indicado que ciertas mutaciones de pérdida parcial de función en el gen *igaA* atenuaban la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el modelo de infección en ratones, y que dicha atenuación era suprimida por mutaciones nulas en los genes *rscC*, *rscD* o *rscB* (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Estos resultados sugerían que la sobreactivación del sistema Rcs podía causar pérdida de virulencia. La primera tarea de esta Tesis fue poner a prueba esta hipótesis mediante el aislamiento de mutantes *rsc* que tuvieran activación constitutiva del sistema, para luego proceder a su caracterización.

1.1. Aislamiento de mutantes Rcs constitutivos

Un fenotipo de los mutantes Rcs constitutivos fácil de identificar, tanto en *E. coli* como en *S. enterica*, es la mucosidad de sus colonias (**Figura C1.1**). Dicha mucosidad se debe a un aumento en la expresión de los genes de la cápsula de ácido colánico (Gottesman *et al.* 1985, Brill *et al.* 1988, Stout y Gottesman 1990).

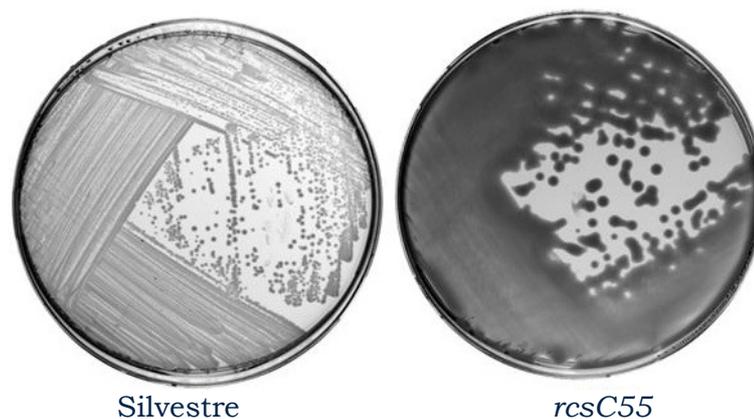


Figura C1.1. Comparación del crecimiento en placa de la estirpe silvestre y uno de los mutantes mucosos aislados en esta Tesis.

Por otro lado, poco antes de iniciar esta Tesis se había descrito un método sencillo para obtener mutantes mucosos de *Salmonella* (Costa y Antón 2001): cuando se siembra un cultivo de la estirpe silvestre en fase estacionaria en placas de LB suplementadas con el antibiótico

mecillinam, la mayoría de las colonias resistentes que aparecen son mucosas. De esta manera pudimos obtener un gran número de mutantes espontáneos de fenotipo mucoso. No era previsible que todos los mutantes obtenidos llevaran mutaciones *rsc*, ya que mutaciones en otros genes como *lon* (Adler y Hardigree 1964, Howard-Flanders *et al.* 1964) e *igaA* (Cano *et al.* 2001, Cano *et al.* 2002) también producen mucosidad. Para identificar mutantes que portaran mutaciones en *rscC*, *rscB* o *rscD* se llevaron a cabo experimentos de cotransducción aprovechando que *rscC*, *rscB* y *rscD* están contiguos en el cromosoma de *Salmonella* (McClelland *et al.* 2001), igual que ocurre en *E. coli* (Gottesman *et al.* 1985). Como donadora se utilizó una estirpe portadora de la mutación *ompC396::Tn10dTc*. Esta inserción es cotransducible con los genes *rscDBC* (**Figura C1.2**). Al transducir la inserción a los mutantes mucosos y seleccionar transductantes resistentes a tetraciclina se obtuvieron dos tipos de resultados. En la mayoría de los mutantes, todos los transductantes obtenidos (más de 200 colonias observadas en cada experimento) mantenían el fenotipo mucoso. En el resto, aproximadamente la mitad de las colonias transductantes perdía el fenotipo mucoso. Esto significaba que las mutaciones de este segundo grupo estaban cercanas a *ompC*, y por tanto probablemente se hallaban en alguno de los genes *rsc*. En concreto, de los 300 mutantes independientes analizados, 27 portaban una mutación que mapeaba en la zona de los genes *rsc*.

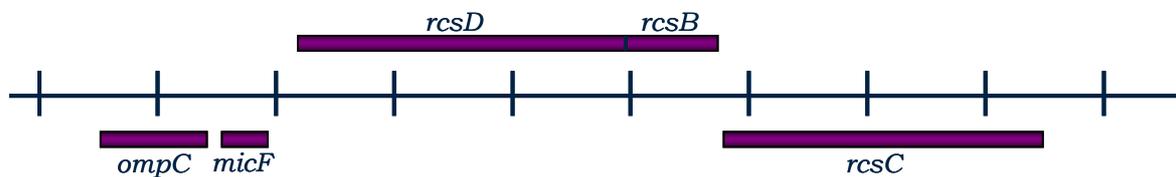


Figura C1.2 Organización de los genes *rsc* y *ompC* en el genoma de *Salmonella*.

1.2. Secuenciación de los mutantes *rsc*

Datos previos de la literatura (Gottesman *et al.* 1985), sumados a los porcentajes de cotransducción con *ompC* calculados en el apartado anterior, indicaban que, de los tres genes *rsc*, el que más probablemente sería portador de mutaciones productoras de fenotipo mucoso era *rscC*. Con este razonamiento, se amplificó por PCR la región *rscC* de los 27 mutantes mucosos que mapeaban en la región *rsc* y se secuenció. Se encontraron mutaciones *rscC* en 24 de los mutantes analizados. La **Figura C1.3** presenta un esquema de la proteína RcsC con indicación de los cambios de secuencia de aminoácidos producidos por las mutaciones halladas. En total se caracterizaron 11 mutaciones distintas (algunas de ellas estaban repetidas, pese a ser independientes). Todas las mutaciones estaban en la porción citoplásmica de RcsC, y se podían clasificar en tres grupos según que se hallaran en el dominio de entrada de la señal, el dominio histidina-quinasa o el dominio receptor.

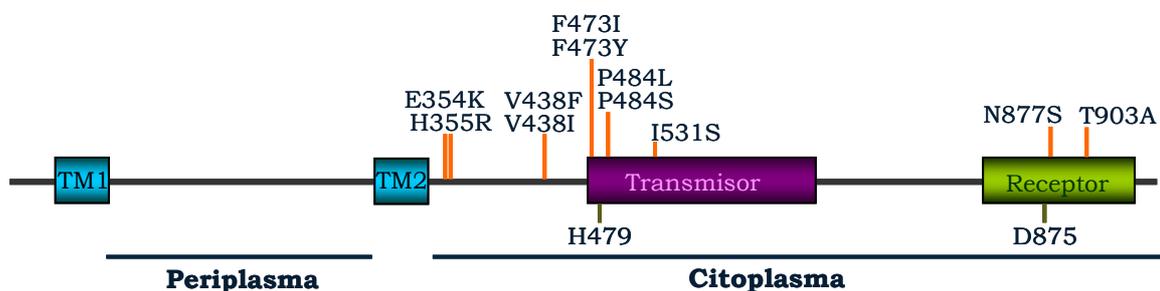


Figura C1.3. Representación esquemática de la proteína RcsC de *Salmonella*. TM1 y TM2 representan los dominios transmembrana. H479 es el residuo histidina fosforilable del dominio transmisor. D875 es el residuo aspártico fosforilable del dominio receptor. Se indican los cambios de aminoácidos provocados por las mutaciones encontradas.

1.3. Dominancia y recesividad de las mutaciones *rscC*

Para establecer si las mutaciones *rscC* encontradas eran dominantes o recesivas aprovechamos el fenotipo de mucosidad. Las mutaciones se introdujeron en una estirpe merodiploide con una duplicación cromosómica de la región *hisH-cysA*, que incluye el gen *rscC* (Camacho y Casadesús 2001). Se hicieron lisados con P22 HT de las

estirpes mutantes *rscC* que además llevaban la mutación *ompC396::Tn10dTc*. La estirpe con la duplicación se transdujo con estos lisados. Como se ha indicado anteriormente, la inserción *ompC396::Tn10dTc* está ligada un 50% a *rscC*. Por tanto se esperaba que las mutaciones dominantes dieran lugar a un 50% de colonias con fenotipo mutante (mucoso). Por el contrario, la transducción de las mutaciones recesivas al merodiploide no debía producir ninguna colonia mucosa. La mayoría de las mutaciones resultaron ser dominantes. Sólo dos mutaciones eran recesivas, y estaban situadas en el dominio receptor (**Tabla C1.1**). Dado que las mutaciones recesivas suelen ser de pérdida de función, este resultado sugiere un posible papel negativo del dominio receptor en la activación del sistema Rcs.

Alelo	Sustitución aminoacídica	Dominancia/ recesividad	Frecuencia de reversión
<i>rscC59</i>	E354K	Dominante	2.56×10^{-9}
<i>rscC53</i>	H355R	Dominante	2.16×10^{-7}
<i>rscC60</i>	V438F	Dominante	3.97×10^{-9}
<i>rscC56</i>	V438I	Dominante	1.07×10^{-9}
<i>rscC64</i>	F473I	Dominante	4.9×10^{-2}
<i>rscC63</i>	F473Y	Dominante	7.87×10^{-3}
<i>rscC58</i>	P484L	Dominante	8.4×10^{-2}
<i>rscC62</i>	P484S	Dominante	7.7×10^{-2}
<i>rscC61</i>	I531S	Dominante	1.08×10^{-3}
<i>rscC54</i>	N877S	Recesivo	2.8×10^{-7}
<i>rscC55</i>	T903A	Recesivo	3.5×10^{-7}

Tabla C1.1. Resumen de las características de los mutantes *rscC* activados de forma constitutiva.

1.4. Frecuencia de reversión de los mutantes *rscC*

Estudios previos habían indicado que los mutantes *igaA* tenían problemas de crecimiento en medio ISM. Si ello se debía a sobreactivación del sistema Rcs, como ocurre con otros fenotipos de los mutantes *igaA*, era de esperar que los mutantes *rscC* obtenidos tuvieran un fenotipo similar. Las pruebas de crecimiento así lo confirmaron. El crecimiento lento en ISM se pudo aprovechar para calcular la frecuencia de reversión de los distintos mutantes como parte de su caracterización genética. Se sembraron cultivos saturados de cada uno de los mutantes en cajas de ISM, para contar el número de revertientes, y en cajas de LB, para hacer conteo de viables. Las frecuencias de reversión obtenidas se muestran en la **Tabla C1.1**.

1.5. Nivel de activación del sistema Rcs en los distintos mutantes

La mucosidad es una consecuencia de la activación del sistema Rcs, ya que ésta conduce a un incremento en la síntesis de cápsula de ácido colánico (Gottesman 1995). Los genes responsables de la síntesis de la cápsula, llamados *wca*, están agrupados en un único operón, tanto en *E. coli* como en *Salmonella* (Stevenson *et al.* 1996, Stout 1996, Stevenson *et al.* 2000). Por tanto, la actividad de una fusión transcripcional *lacZ* en uno de dichos genes se podía usar para estimar el grado de activación del sistema Rcs. Se usó una fusión *gmm::lacZ* (*gmm* se llama también *wcaH*) y se midió la actividad β -galactosidasa de cultivos en fase exponencial en medio LB. Como se observa en la **Figura C1.4**, la expresión de *wcaH* está reprimida en la estirpe silvestre, mientras que en los mutantes se observan diversos grados de expresión, lo que indica diferentes grados de activación del sistema Rcs.

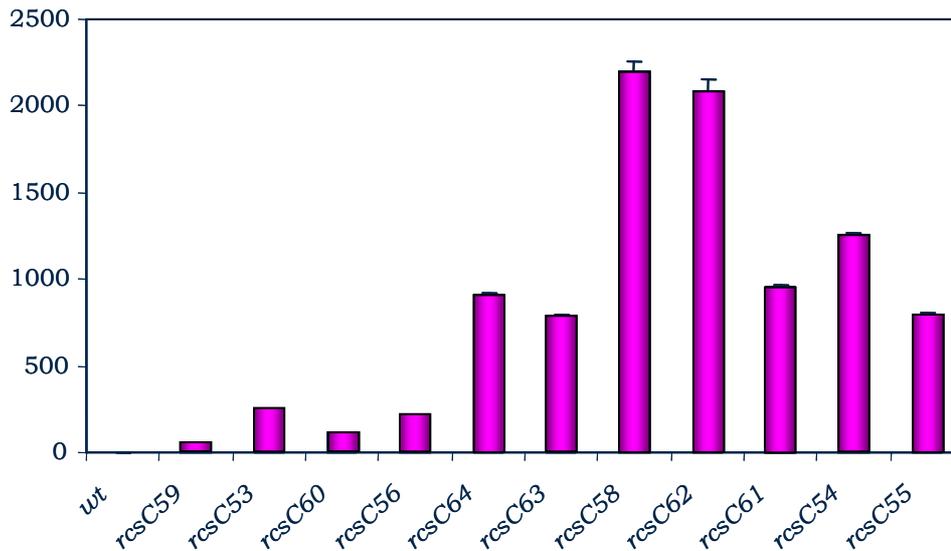


Figura C1.4. Nivel de activación del sistema Rcs en los distintos mutantes. Se midió la actividad β -galactosidasa de una fusión *gmm::lacZ* en los mutantes *rcsC*. Los datos mostrados son la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

1.6. Los mutantes *rcsC* con activación constitutiva del sistema Rcs presentan un defecto de movilidad

Estudios previos habían mostrado que los mutantes *igaA* tienen un defecto en movilidad, que se suprime mediante mutaciones nulas en los genes *rcsB* o *rcsC* (Cano *et al.* 2002). Este resultado sugería que la sobreactivación del sistema podía ser responsable del defecto en movilidad. Se observaron al microscopio cultivos en fase exponencial del silvestre y de los mutantes *rcsC* constitutivos. Todos los mutantes eran inmóviles. Este resultado se confirmó mediante experimentos en medio de movilidad semisólido. Para ello se prepararon cultivos en medio de movilidad con agitación, se mojó un palillo estéril en cada cultivo y se inoculó el centro de una caja de medio semisólido. Como se observa en la **Figura C.1.5**, el silvestre crece formando un halo cuyo diámetro aumenta progresivamente en función de la velocidad de movimiento de las bacterias. Sin embargo, los mutantes sólo crecieron en el área de inoculación, lo que era indicativo de su falta de movilidad.

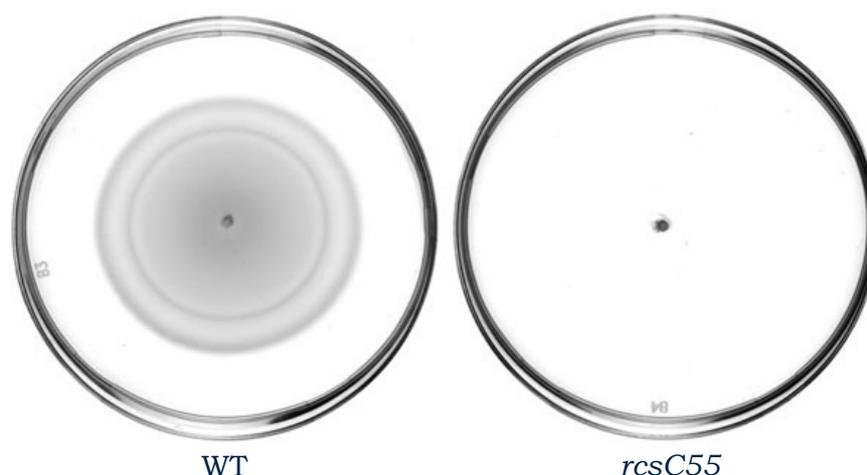


Figura C1.5. Ensayo de movilidad de la estirpe silvestre y el mutante *rscC55*. Las bacterias se inocularon en el centro de las cajas de medio de movilidad y se dejaron crecer durante 6 h a 37°C.

1.7. El operón *flhDC* está reprimido en mutantes *rscC* constitutivos

La inmovilidad de los mutantes *rscC* constitutivos sugiere que tienen reprimida la expresión de los genes del flagelo. Para examinar esta posibilidad se usó una fusión *lacZ* en el operón *flhDC*. Este operón se halla en la cúspide de la cascada genética que controla la síntesis flagelar (Gygi *et al.* 1995, Macnab 1996, Furness *et al.* 1997, Claret y Hughes 2000). Como se muestra en la **Figura C1.6** la expresión de *flhDC* disminuyó notablemente en todos los mutantes *rscC*. Además, se observa una correlación negativa entre la expresión de *flhDC* y la de *gmm*. Este resultado era esperable, ya que el sistema Rcs activa la expresión de la cápsula y reprime la del flagelo (Francez-Charlot *et al.* 2003).

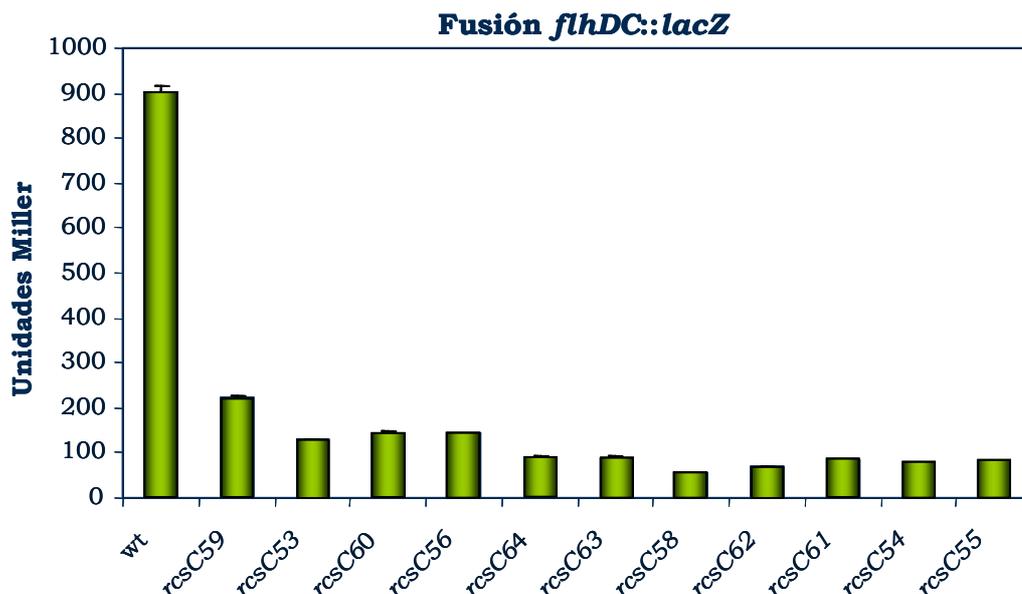


Figura C1.6. Efecto de las mutaciones *rcsC* constitutivas sobre la expresión de *flhDC*. Se midió la actividad β -galactosidasa de la fusión *flhDC::MudA* en fondos mutantes y en la estirpe silvestre. Se muestra la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

1.8. Una mutación nula en *rcsB* suprime la mucosidad, la falta de movilidad y la resistencia a mecillinam de los mutantes *rcsC* constitutivos

La proteína RcsB es un elemento que está por debajo de RcsC en la cascada de señalización, que se inicia con la activación de RcsC y culmina en la activación o represión de la expresión de determinados genes por parte de RcsB. Por tanto, era de esperar que una mutación *rcsB* nula suprimiera los fenotipos observados en los mutantes *rcsC* activados permanentemente. Para ensayar esta hipótesis, se construyeron dobles mutantes *rcsB rcsC* y se analizaron sus fenotipos. En todos los casos, la mutación *rcsB* suprimió los fenotipos de mucosidad, falta de movilidad y resistencia a mecillinam característicos de los mutantes *rcsC* constitutivos. Ello indica que los fenotipos observados se deben a la activación del sistema Rcs a través de RcsB.

1.9. Los mutantes *rscC* activados de manera constitutiva son avirulentos en ratones BALB/c

Ya se ha indicado que un objetivo de esta Tesis era poner a prueba la hipótesis de que la sobreactivación del sistema Rcs daba lugar a atenuación. Los mutantes *rscC* constitutivos obtenidos en este trabajo eran idóneos para investigar dicha posibilidad, ya que afectaban directamente a uno de los componentes del sistema Rcs. Además, disponíamos de una batería de mutantes con distintos grados de activación del sistema.

Para los ensayos de virulencia se inocularon ratones BALB/c por vía intraperitoneal usando una mezcla de la estirpe silvestre y uno de los mutantes *rscC* constitutivos, y se calculó el índice de competitividad para cada mutante. Los ensayos se realizaron con mutantes que presentaban grados diversos de activación del sistema y que no tenían una frecuencia de reversión muy elevada. Se eligieron dos mutaciones dominantes y dos recesivas. Todos los mutantes estaban muy atenuados, y su atenuación presentaba correlación con el grado de activación del sistema Rcs. Los datos se representan en la **Figura C1.7**.

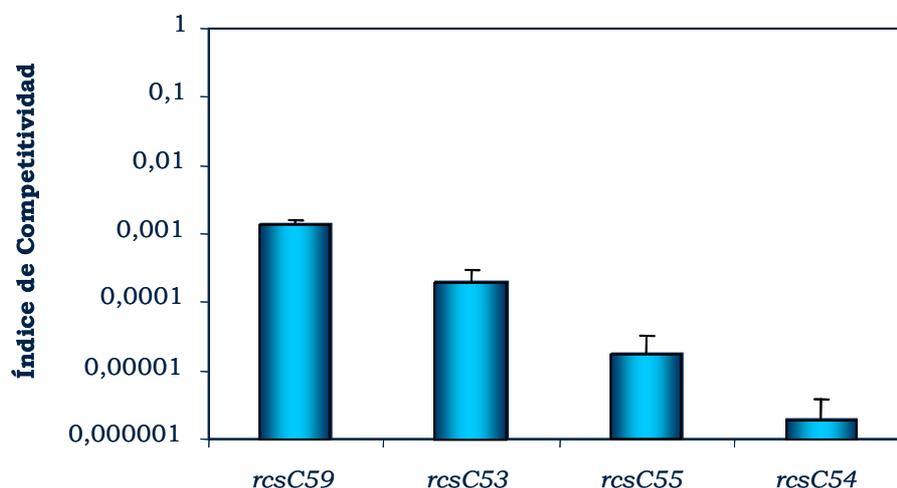


Figura C1.7. Los mutantes *rscC* constitutivos están atenuados en ratones. Se calculó un índice de competitividad para los mutantes cuyos alelos se indican, después de realizar infecciones mixtas intraperitoneales de cada mutante con la estirpe silvestre, en ratones BALB/c. Los alelos están ordenados de menor a mayor activación del sistema Rcs, según su efecto en la expresión de *gmm*. Los índices representados son la media de tres infecciones. Las barras de error representan la desviación típica.

1.10. Los mutantes *rscC* constitutivos no tienen defecto de crecimiento *in vitro*

Una posible explicación de la atenuación en la infección del ratón era que los mutantes *rscC* activados de forma constitutiva tuvieran problemas de crecimiento. Aunque era poco probable que ésta fuera la causa del efecto observado ya que en los ensayos intraperitoneales hay pocas generaciones, dicha posibilidad fue descartada mediante un experimento de competitividad *in vitro*. Para ello, se hizo una mezcla similar a la que se usa en ensayos en ratón y se incubó a 37°C en medio LB líquido. Igual que en los ratones, se calculó la relación entre el número de unidades formadoras de colonias del mutante y del silvestre en el inóculo inicial y a las 24 h. Con estos datos se obtuvo el índice de competitividad *in vitro*, que se representa en la **Figura C1.8**. Ninguno de los mutantes presentaba cambios significativos de crecimiento. Por tanto, la avirulencia de estos mutantes no se debía a crecimiento deficiente.

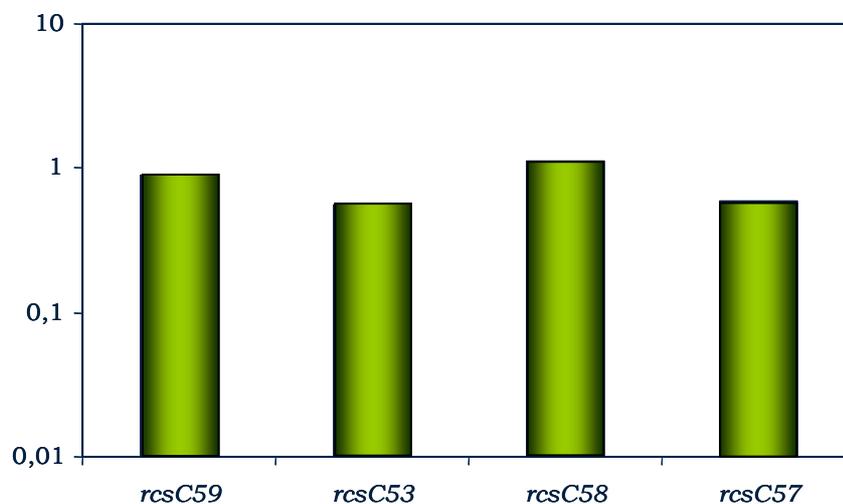


Figura C1.8. Índice de competitividad *in vitro* de los mutantes *rscC* constitutivos frente a la estirpe silvestre. Se calculó el índice de competitividad para los mutantes cuyos alelos se indican después de cultivarlos junto a la estirpe silvestre en LB durante 24 horas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

1.11. Una mutación nula en *rscB* suprime la avirulencia de los mutantes *rscC* constitutivos

Ya se ha indicado que todos los fenotipos observados en los mutantes *rscC* constitutivos eran suprimidos por una mutación *rscB* (**apartado 1.8**). Era de esperar, por tanto, que la avirulencia que presentan estos mutantes en ratones también fuera suprimida por una mutación en *rscB*. Para ensayar esta hipótesis se midieron los índices de competitividad para los dobles mutantes correspondientes y la estirpe silvestre. Como se esperaba, la supresión fue completa en todos los mutantes, confirmando así que la avirulencia se debe a la sobreactivación del sistema Rcs. Los datos se representan en la **Figura C1.9**.

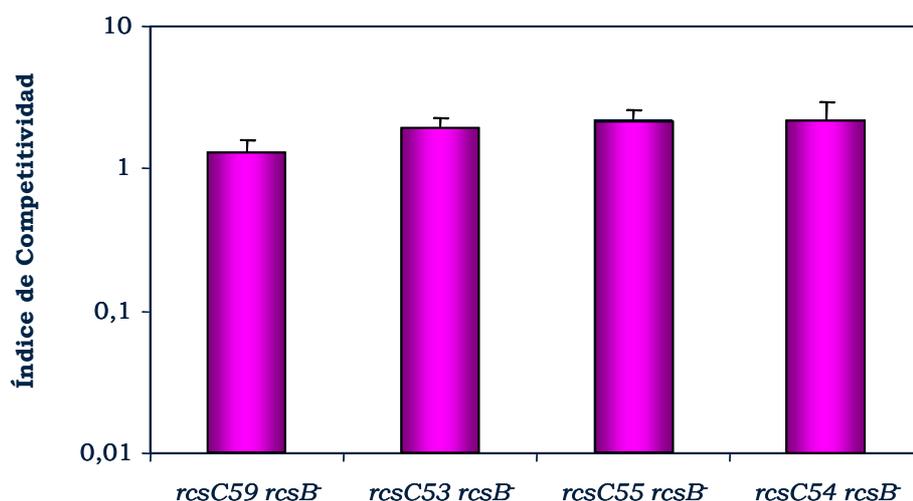


Figura C1.9. Una mutación nula en *rscB* suprime la atenuación de los mutantes *rscC* constitutivos. Se calculó el índice de competitividad para dobles mutantes *rscC rcsB* tras infecciones mixtas con la estirpe silvestre realizadas por vía intraperitoneal sobre ratones BALB/c. Los alelos están ordenados como en la figura C1.7. Los índices representados son la media de tres infecciones. Las barras de error representan la desviación típica.

1.12. Una mutación en *gmm* suprime parcialmente la avirulencia de los mutantes *rscC* constitutivos

La atenuación de los mutantes *rscC* activados permanentemente se puede deber tanto a genes activados como a genes reprimidos por el sistema Rcs. Existen dos conjuntos de genes, de los que se conoce muy bien la regulación por Rcs tanto en *E. coli* como en *Salmonella*, que podrían ser los responsables de la atenuación que presentan los mutantes *rscC* constitutivos: los genes de la cápsula (Brill *et al.* 1988, Cano *et al.* 2002) y los del flagelo (Cano *et al.* 2002, Francez-Charlot *et al.* 2003).

El control de la síntesis del flagelo y de la quimiotaxia se lleva a cabo a través del regulador *flhDC* (Macnab 1996). Debido a la falta de movilidad, los mutantes *flhDC* de *Salmonella* son defectivos en la invasión de células epiteliales en cultivo (Young *et al.* 2000, Schmitt *et al.* 2001). En otras especies bacterianas también se ha descrito que estos genes contribuyen a la virulencia (Givaudan y Lanois 2000, Tans-Kersten *et al.* 2004). Sin embargo, en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium los mutantes *flhDC* no presentan atenuación [**Figura C1.10**, (Domínguez-Bernal *et al.* 2004)]. Ello indica que los genes regulados por FlhDC no son necesarios para la virulencia. Por tanto, la alteración de la expresión de *flhDC* no explica la avirulencia del mutante *rscC* constitutivo.

Otra posibilidad era que la superproducción de cápsula tuviera un papel negativo en la virulencia de *Salmonella*. Para investigar esta posibilidad medimos el índice de competitividad de dobles mutantes *gmm rscC* constitutivos frente a la estirpe silvestre. Estos mutantes no son mucosos, ya que *gmm* es un gen estructural de la síntesis de la cápsula de ácido colánico. Como se observa en la **Figura C1.10**, la atenuación que presentaban los mutantes *rscC* constitutivos era suprimida parcialmente por una mutación *gmm*. Sin embargo, ninguno de los dobles mutantes tenía un índice de competitividad igual a 1, lo que habría significado que eran tan virulentos como la estirpe silvestre. Una vez más, la atenuación que presentaban se podía correlacionar con el grado de activación del sistema Rcs. Dado que la producción de cápsula

depende del regulador positivo RcsA (Gottesman 1995), un mutante nulo *rscA* debería suprimir parcialmente la avirulencia del mutante *rscC* constitutivo. Para ensayar esta hipótesis se calculó el índice de competitividad de dobles mutantes *rscA rscC* constitutivos frente a la estirpe silvestre. Los resultados obtenidos (**Figura C1.10.a**) mostraban que el comportamiento era muy similar al de los dobles mutantes *gmm rscC* constitutivos.

Además, se ensayó la avirulencia del triple mutante *gmm rscA rscC* constitutivo. Los resultados muestran que no hay diferencias entre los dobles mutantes y el triple mutante (**Figura C1.10.b**). En resumen, la supresión de la atenuación por mutaciones *gmm* o *rscA* sugiere que la sobreproducción de cápsula es uno de los factores que contribuyen a la avirulencia en mutantes *rscC* constitutivos, y el hecho de que la supresión no sea completa indica que deben existir otros genes regulados por Rcs implicados en la virulencia.

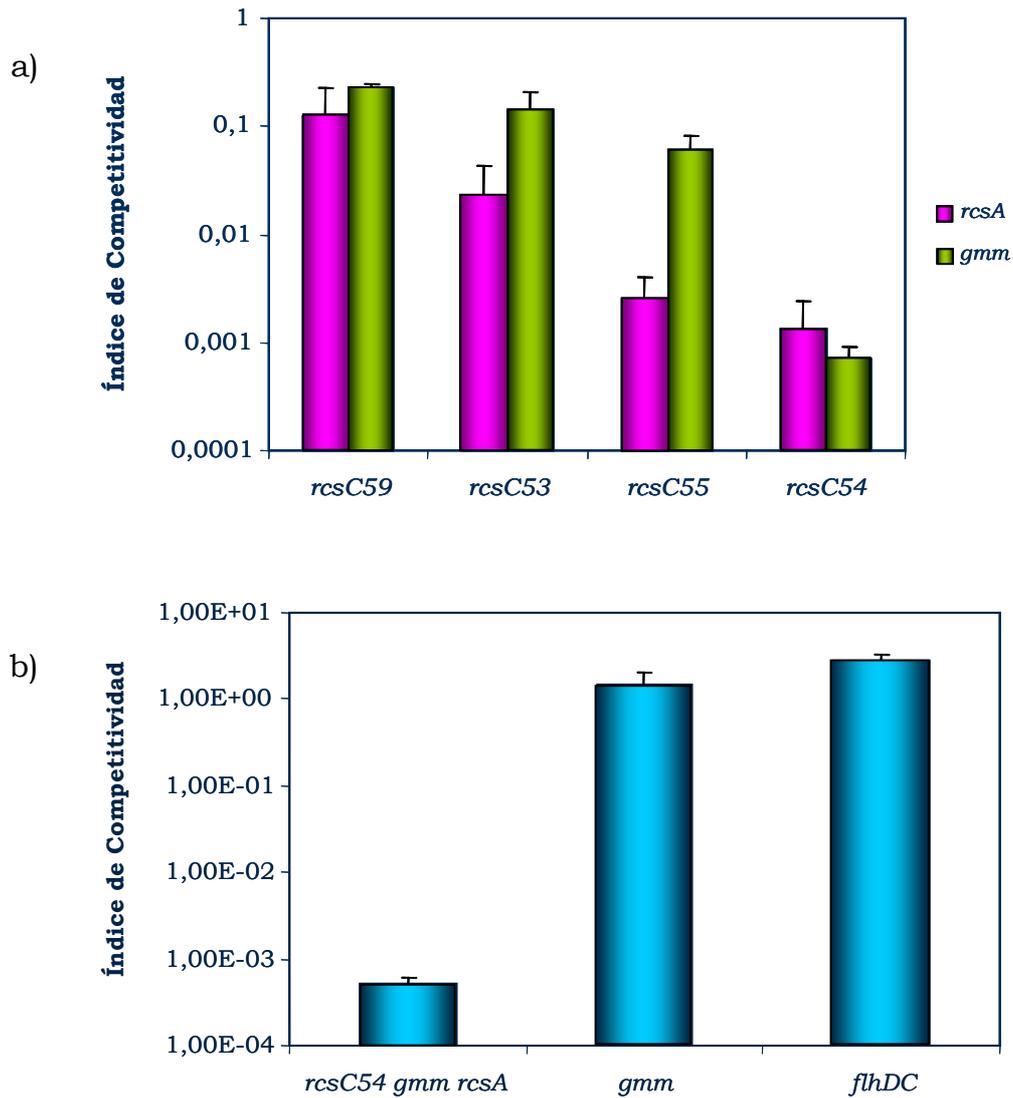


Figura C1.10. La superproducción de cápsula contribuye a la atenuación de los mutantes *rscC* constitutivos. En cada caso se representa la media y la desviación típica de tres infecciones independientes
 (a) Se midió el índice de competitividad de mutantes *rscC gmm* (barras de color verde) y *rscC rcsA* (barras violetas) frente a la estirpe silvestre en infecciones intraperitoneales de ratones BALB/c. Los alelos están ordenados igual que en las figuras anteriores.
 (b) Se ensayó la virulencia de dos estirpes control y la del triple mutante *gmm rcsA rcsC* constitutivo.

Capítulo 2

Escrutinios genéticos para la identificación de genes regulados por Rcs y caracterización de los mismos

2.1. Escrutinios genéticos para la identificación de genes regulados por el sistema Rcs

Uno de los objetivos de esta Tesis era la identificación de nuevos genes regulados por el sistema Rcs en *Salmonella*. Además, en el capítulo anterior pusimos de manifiesto la existencia de genes regulados por el sistema Rcs, no definidos aún, implicados en la virulencia de *Salmonella enterica*. Por ello resultaba de particular interés la identificación de genes específicos de *Salmonella*. Con este objetivo se generó una colección de fusiones transcripcionales *lacZ* aleatorias en el cromosoma de *Salmonella* y se comparó la expresión de cada una de las fusiones en condiciones de activación fuerte o débil del sistema Rcs. Para llevar a cabo esta comparación se idearon dos sistemas de escrutinio independientes que se describen a continuación.

a) Identificación de genes regulados por IgaA

El producto del gen *igaA* ejerce un efecto negativo sobre la activación del sistema Rcs. Mutaciones nulas en *igaA* son letales. Mutantes con ciertas mutaciones puntuales, como en los alelos *igaA1* e *igaA5*, son viables pero presentan mucosidad y falta de movilidad. Mutaciones en *rscC*, *rscD* o *rscB* suprimen estos fenotipos, incluyendo la letalidad de las mutaciones nulas. Ello sugiere que los efectos fenotípicos de las mutaciones *igaA* son consecuencia de la sobreactivación del sistema Rcs (Cano et al. 2002; Domínguez-Bernal et al. 2004). Por tanto es de esperar que los genes regulados positivamente por RcsB estén regulados negativamente por IgaA y viceversa. Para el primer escrutinio se construyó la estirpe SV4573 (**Tabla M1**), portadora de la mutación nula *igaA3::Cm^r* complementada con el alelo *igaA* silvestre expresado desde un derivado del plásmido pBAD18 bajo un promotor dependiente de arabinosa (Guzman *et al.* 1995), denominado pNG1166 (**Tabla M2**). En medio LB sólido con arabinosa esta estirpe es viable y produce colonias de fenotipo silvestre (no mucoso). En cambio, en medio LB con glucosa, la misma estirpe muestra los fenotipos asociados a la falta de IgaA. Aunque la mutación *igaA3::Cm^r* es letal, cuando las colonias

formadas en LB-arabinosa se replicaban a LB-glucosa había crecimiento residual que era útil para el escrutinio. En LB-glucosa, sin embargo, se observaba mucosidad, lo que confirmaba que en esas condiciones había expresión reducida de *igaA* y consiguiente activación de Rcs. Para la detección de loci regulados por IgaA, la estirpe SV4573 se mutagenizó con el elemento *MudJ* para generar fusiones transcripcionales *lacZ* (Casadaban y Chou 1984). *Mu* es un elemento transponible sin diana específica, por lo que en principio es posible obtener inserciones en cualquier gen no esencial. *MudJ* porta un gen de resistencia a Km que permite la selección positiva de clones portadores del transposón. Además, *MudJ* lleva un operón *lac* sin promotor que permite la generación de fusiones transcripcionales cuando el elemento se inserta en la orientación adecuada. Para la mutagénesis se empleó un lisado de P22 HT obtenido sobre la estirpe TT10288, que se transdujo sobre la estirpe SV4573. Se hicieron réplicas de 10.000 aislados independientes portadores de inserciones *MudJ* a cajas de LB-glucosa y de LB-arabinosa en presencia del indicador cromogénico X-Gal. Las diferencias de color entre ambos medios eran indicativas de que la fusión en cuestión estaba regulada por IgaA. Todo el procedimiento se esquematiza en la **Figura C2.1**. Inicialmente se observó expresión diferencial para 114 fusiones. Con estas fusiones se realizaron experimentos de reconstrucción y se comparó la actividad β -galactosidasa de cada fusión en fondo silvestre y en fondo *igaA5*. Ello permitió eliminar fusiones cuyo fenotipo era debido a mutaciones secundarias, inserciones en el plásmido y regulación directa por arabinosa. Finalmente se eligieron 9 fusiones para continuar el estudio.

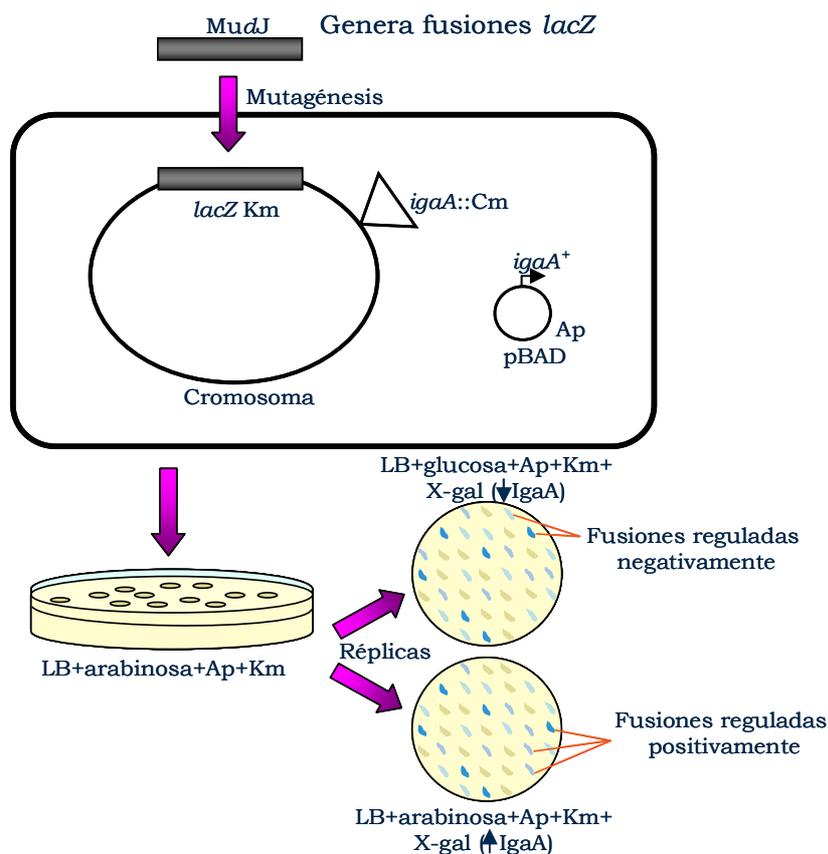


Figura C2.1. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar genes regulados por IgaA. Se construyó una estirpe con una mutación nula en *igaA* que llevaba un plásmido con un alelo silvestre *igaA* expresado bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. *igaA* se expresa en presencia de arabinosa como única fuente de carbono pero no en presencia de glucosa. Se obtienen fusiones *lacZ* gracias a la mutagénesis con MudJ. Se estudió el patrón de expresión de 10.000 fusiones independientes en cajas de medio LB con glucosa o arabinosa suplementado con X-Gal.

b) Identificación de genes regulados por RcsB

Para este escrutinio se empleó el plásmido pIZ1589, un derivado de pBAD18 que lleva el gen *rscB* bajo el control del promotor de la arabinosa. Como experimento previo, se transformó la estirpe silvestre 14028 con pIZ1589, y se sembró en placas de LB + glucosa o arabinosa. Las colonias eran mucosas en LB + arabinosa y no mucosas en glucosa. Esto indica que la sobreexpresión de *rscB* imita la sobreactivación del sistema, al igual que ocurre en *E. coli* (Brill *et al.* 1988). Por tanto, la construcción era útil para nuestro propósito.

Para realizar el escrutinio se introdujo el plásmido pIZ1589 en la estirpe SV4514 (*gmm::MudQ*), generando la estirpe SV5090. La mutación *gmm* evitaba que las colonias fueran mucosas, ya que *gmm* es un gen necesario para la síntesis de la cápsula. Ello permitía observar mejor el color de las colonias. Sobre esta estirpe se realizó una mutagénesis con *MudJ* del modo descrito en el apartado anterior. Para la mutagénesis se empleó un lisado de P22 HT obtenido sobre TT10288. La estirpe receptora fue SV5090. Las colonias *Km^r* se replicaron con palillos a cajas de LB-glucosa y LB-arabinosa, y se comparó el color en uno y otro medio. Este método se resume en la **Figura C2.2**. Se analizaron 20.000 colonias. Tras someterlas a las mismas comprobaciones del apartado anterior, se eligieron 17 fusiones para su estudio posterior.

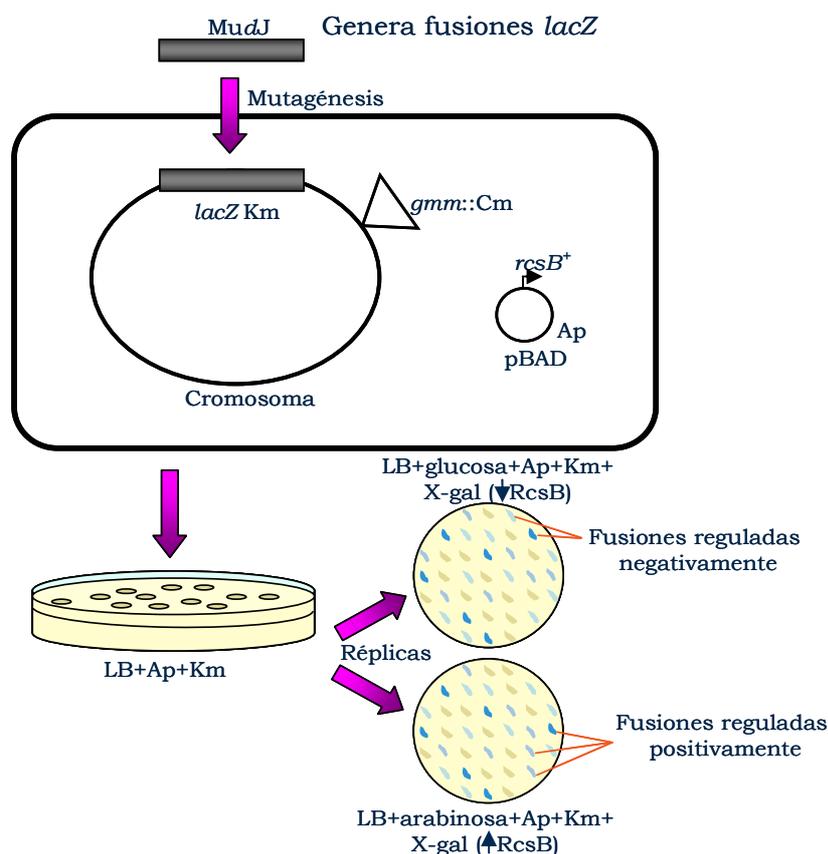


Figura C2.2. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar genes regulados por *RcsB*. En una estirpe con una mutación nula en *gmm*, se introdujo un plásmido con una copia del gen silvestre *rcsB* bajo el control de *P_{BAD}*. *rcsB* se expresa en medio con arabinosa pero no en medio con glucosa. Se obtienen fusiones *lacZ* gracias a la mutagénesis con *MudJ*. Se estudió el patrón de expresión de 20.000 fusiones independientes en cajas de medio LB con glucosa o arabinosa suplementado con X-Gal. La mutación *gmm* se introdujo para evitar la mucosidad y, de esa manera, facilitar la comparación de colores en los diferentes medios.

2.2. Expresión de las fusiones obtenidas e identificación de inserciones en genes de cápsula y de flagelo

La actividad β -galactosidasa, en fondo silvestre y fondo *igaA5*, de las fusiones obtenidas en los escrutinios se indica en la **Tabla C2.1**.

Candidato	Silvestre	<i>igaA5</i>	Grado de inducción
i2	5	727	+145.4
i13	4	706	+176.5
i18	3	270	+90
i36	648	5	-129.6
i59	248	7	-35.4
i69	189	2	-94.5
i70	11,8	1,5	-35.4
i74	68	369	+5.4
i88	1	67	+67
r20	5.79	244.92	+42.3
r36	2200	41.41	-53.12
r39	277.45	2.11	-131.5
r44	7.87	398.37	+50.62
r50	67	162.58	+2.4
r52	138	11	-12.5
r53	8.74	113.31	+13
r55	54.2	10.9	-4.9
r56	22	6	-3.6
r71	1818	974	-1.9
r85	52.46	19.56	-2.68
r97	88.42	21.5	-4.11
r111	29.91	7.6	-3.9
r142	47.79	1.82	-26.26
r150	2.3	9.32	+4.05
r171	28.7	5.61	-5,11
r172	53.2	320.58	+6.03

Tabla C2.1. Tabla resumen de las inserciones obtenidas en los escrutinios. Las inserciones numeradas con una i se obtuvieron en el primer escrutinio (con el gen *igaA* expresado desde el derivado del pBAD18) y las inserciones con r son las obtenidas en el segundo escrutinio (con *rCSB* expresado desde el plásmido). El grado de inducción se

calculó como el cociente entre *igaA5*/silvestre para genes regulados positivamente por RcsB, y el cociente silvestre/*igaA5* para genes regulados negativamente por RcsB. El signo indica si la regulación era positiva o negativa.

Era de esperar que algunas de las inserciones detectadas se encontraran en genes cuya regulación por Rcs ya era conocida. Entre éstos hay dos grandes grupos de genes, los necesarios para la síntesis de cápsula de ácido colánico (Gottesman *et al.* 1985, Brill *et al.* 1988), que se encuentran todos agrupados en una región cromosómica de unas 20 kb, y los relacionados con la síntesis de flagelo (Cano *et al.* 2002), cuya mutación debería provocar inmovilidad. Para detectar las inserciones en genes del primer grupo probamos la capacidad de las diferentes inserciones para suprimir el fenotipo mucoso (debido a superproducción de ácido colánico) del mutante *igaA5*. Cuatro de las inserciones detectadas en el primer escrutinio, denominadas i2, i13, i18 e i88, fueron capaces de suprimir la mucosidad. Además, experimentos de cotransducción confirmaron que las cuatro se encontraban ligadas al gen *gmm*, uno de los genes de la cápsula. Por otro lado, tres de las inserciones estudiadas, denominadas i69, r36 y r39, producían falta de movilidad cuando se introducían en la estirpe silvestre, lo que indicaba que se encontraban en genes necesarios para la síntesis del flagelo. El hallazgo de estas inserciones era indicativo del éxito de ambos escrutinios para identificar genes regulados, positiva o negativamente, por el sistema Rcs. Sin embargo, puesto que estas inserciones se encontraban en genes cuya regulación ya era conocida, no se continuó su estudio.

2.3. Caracterización de nuevos miembros del regulón Rcs

Para determinar dónde estaban las demás inserciones *MudJ*, y por tanto identificar el gen regulado por Rcs en cada caso, utilizamos dos estrategias distintas. Por un lado, clonamos en pBluescript SKII fragmentos de ADN cromosómico portadores del gen Km^r de *MudJ*. Para

ello se usaron las enzimas de restricción *Bam*HI o *Pst*I, que tienen una diana dentro de *Mud*J pero dejan intacto el gen de resistencia. Para ciertas inserciones esta estrategia no dio resultado, presumiblemente debido a que los fragmentos de ADN con el gen de resistencia a Km eran demasiado grandes. En esos casos se empleó la PCR inversa (**Apartado 9** de **Material y métodos**). Todas las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el oligonucleótido MuL (Torreblanca *et al.* 1999). La **Tabla C2.2** contiene una relación de los mutantes obtenidos, indicando el gen afectado en cada caso.

Candidato	Gen	Proteína	Referencia
i36	<i>trg</i>	Proteína de quimiotaxia	(Macnab 1996, Stock y Surette 1996)
i59, i70	<i>srfB</i>	Desconocida	(Worley <i>et al.</i> 2000)
i74, r50	<i>bapA</i>	Proteína grande con repeticiones	(Latasa <i>et al.</i> 2005)
r20, r44	<i>yjbH</i>	Lipoproteína de membrana externa	(Ferrières y Clarke 2003)
r52	<i>narH</i>	Subunidad β de la nitrato reductasa A	(Stewart 1982, Stewart 1988, Blasco <i>et al.</i> 1989)
r53	<i>yiaD</i>	Lipoproteína de membrana externa	(Ferrières y Clarke 2003)
r55, r56	<i>siiE</i>	Proteína secretada de la SPI-4	(Wong <i>et al.</i> 1998, Morgan <i>et al.</i> 2004)
r71	<i>dcuB</i>	Transportador anaeróbico de C ₄ -dicarboxilato	(Golby <i>et al.</i> 1998, Ferrières y Clarke 2003)
r72, r142	<i>srfA</i>	Similar a antígenos nucleares	(Worley <i>et al.</i> 2000)
r85	STM2176	Transferasa de S del glutatión	(McClelland <i>et al.</i> 2001)
r97	<i>melB</i>	Absorción de melibiosa	(Prestidge y Pardee 1965, Schmitt 1968, Okada <i>et al.</i> 1981, Mizushima <i>et al.</i> 1992)

r111	<i>yhhJ</i>	Transportador de la superfamilia ABC	(Saurin <i>et al.</i> 1999)
r150	PSLT071	Función desconocida	(Parkhill <i>et al.</i> 2001)
r172	STM1491	Sistema de transporte tipo ABC de prolina/glicina	(McClelland <i>et al.</i> 2001)

Tabla C2.2. Resumen de los candidatos obtenidos.

2.4. Características generales de los genes obtenidos en los escrutinios y estudio de su regulación transcripcional

Mutaciones puntuales en el gen esencial *igaA* producen la sobreactivación del sistema Rcs (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Por tanto, estas fusiones deberían tener idéntico fenotipo en fondo *igaA* y *rscC* constitutivo. Además, la diferencia de actividad observada en fondo *igaA* debería ser suprimida por mutaciones nulas en *rscB* o *rscC*. También era interesante determinar si dichas fusiones estaban reguladas por el co-regulador RcsA (Gottesman *et al.* 1985) o por FlhDC, el regulador principal de la síntesis de flagelo (Macnab 1996), que está regulado por RcsB. Para investigar todas estas hipótesis se midieron actividades β -galactosidasa de las fusiones obtenidas.

A continuación se ofrecen algunos datos acerca de cada uno de los genes obtenidos en estos escrutinios y de su regulación transcripcional, ordenados según la posible localización celular de sus productos: proteínas secretadas, de membrana externa, de membrana interna o citosólicas. Exceptuamos de este estudio los genes *srfA* y *srfB*, cuyo estudio será objeto del siguiente capítulo.

a) *bapA*

Este gen es específico de *Salmonella*, y forma parte de la unidad transcripcional *bapABCD*. Codifica una proteína grande con repeticiones que se localiza en la superficie celular y es necesaria para la formación de biofilm en *S. enterica* serovar Enteritidis (Latasa *et al.* 2005). Es secretada por un sistema de secreción tipo I especificado por los otros miembros del operón. BapA es necesaria para la colonización del epitelio

intestinal en *S. enterica* serovar Enteritidis (Latasa *et al.* 2005). Con esta fusión se obtuvieron resultados variables de un experimento a otro.

Figura C2.3. Actividad β -galactosidasa del gen *bapA* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión total en fondo *rcsB* o *rcsC*, y parcial en fondo *rcsA*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

b) *siuE*

Forma parte de la unidad transcripcional *siiABCDEF*, que constituye la isla de patogenicidad 4. Por tanto, es un gen específico de *Salmonella*. Su producto es una proteína secretada por un sistema de secreción tipo I, codificado en la misma unidad transcripcional (Morgan *et al.* 2007). Estos genes son necesarios para la infección intestinal en ratones, pero no para la infección sistémica (Morgan *et al.* 2004).

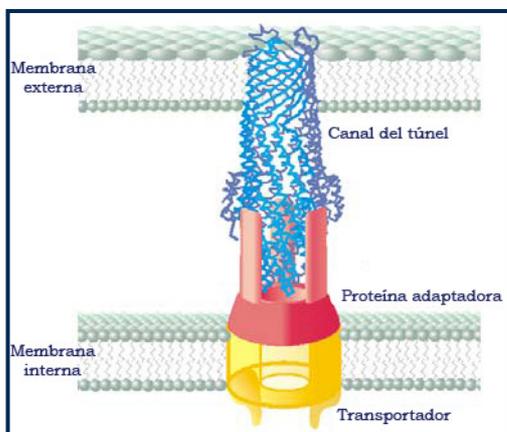


Figura C2.4.a. Esquema representativo de un sistema de secreción tipo I (Andersen 2003).

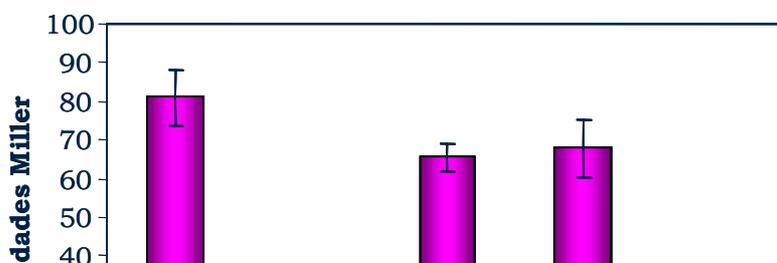


Figura C2.4.b. Actividad β -galactosidasa del gen *siiE* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rcsB* o *rcsC*, y un efecto parcial de FlhDC. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

c) *yjbH*

Este gen forma parte del operón *yjbEFGH*. Existe un homólogo en *E. coli* que se identificó como regulado por RcsC en un escrutinio con fusiones transcripcionales (Ferrières y Clarke 2003). En el mismo estudio se identificaron *yjbE*, *yjbF* e *yjbG* como miembros del regulón, aunque usando “macroarrays”. El análisis *in silico* indica que YjbH podría ser una lipoproteína de membrana externa. Recientemente se ha descrito que el operón *yjb* está implicado en la producción de exopolisacáridos (Ferrières *et al.* 2007).

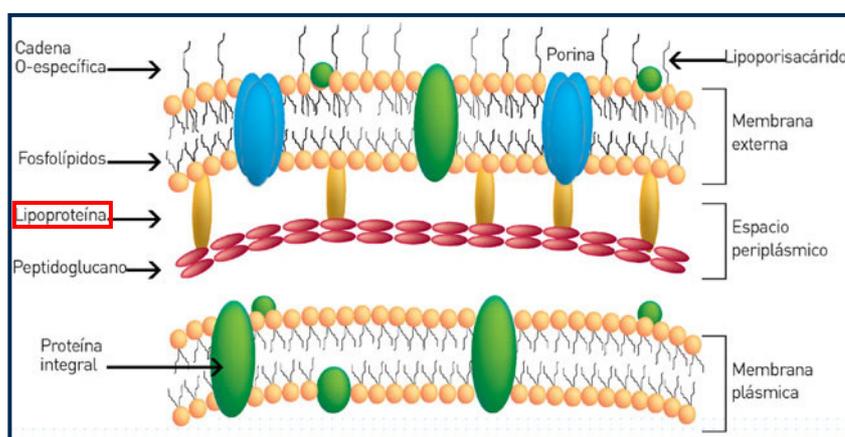


Figura C2.5.a. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Rosas Pérez *et al.* 2006).

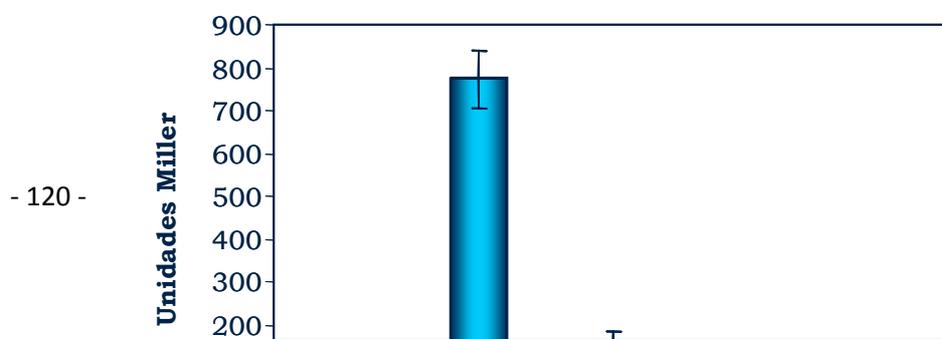


Figura C2.5.b. Actividad β -galactosidasa del gen *yjbH* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión total en fondo *rcsB* o *rcsC*, y parcial en fondo *rcsA*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

d) *yiaD*

Igual que ocurre con *yjbH*, el análisis de secuencia sugiere que podría codificar una lipoproteína de membrana externa. Se trata de otro gen identificado como regulado por Rcs en *E. coli* (Ferrières y Clarke 2003). Según otro estudio de genes regulados por Rcs en *E. coli* (Hagiwara *et al.* 2003), muchos de ellos codifican proteínas asociadas a la envuelta celular. Por tanto, resulta interesante que hayan aparecido *yjbH* e *yiaD* en nuestros escrutinios.

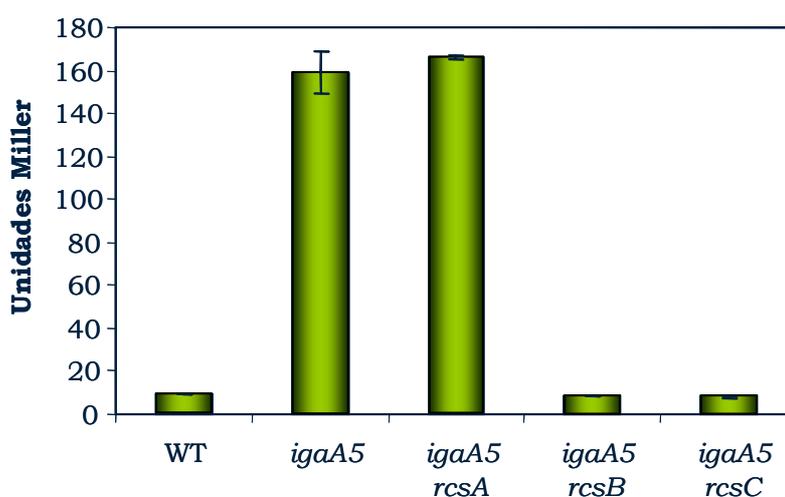


Figura C2.6. Actividad β -galactosidasa del gen *yiaD* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rcsB* o *rscC*, pero no hay efecto de RcsA. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

e) *trg*

Codifica un receptor quimiotáctico para ribosa y galactosa. Todos los genes de quimiotaxia están regulados por FlhDC (Macnab 1996, Stock y Surette 1996), igual que los del flagelo. Puesto que el operón *flhDC* está regulado por RcsB, es lógico que *trg* lo esté.

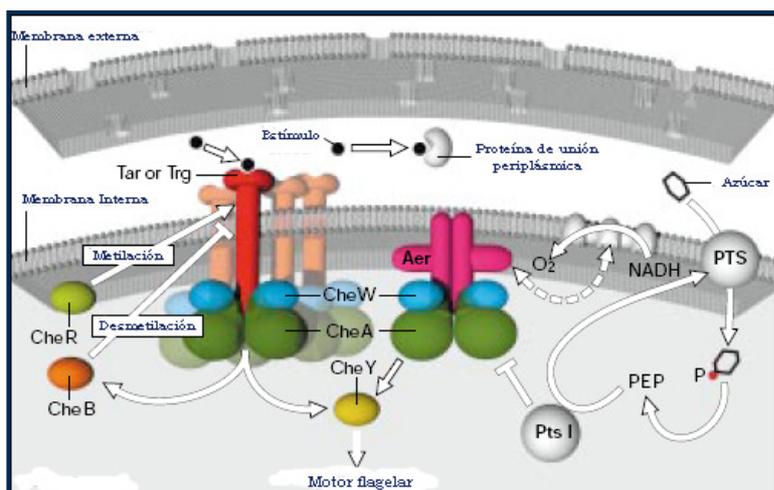


Figura C2.7.a. Esquema de la cascada de la señal en la quimiotaxia (Grebe y Stock 1998).

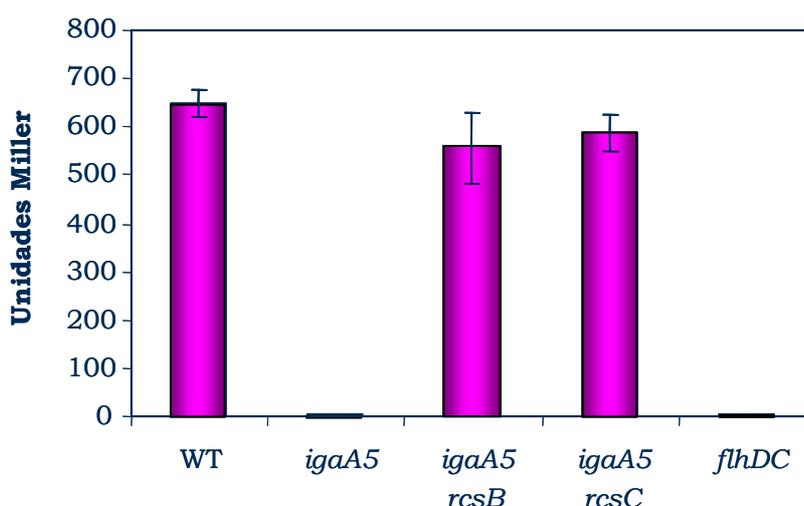


Figura C2.7.b. Actividad β-galactosidasa del gen *trg* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB* o *rscC*, y una clara regulación por *flhDC*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

f) *narH*

Forma parte de la unidad transcripcional *narGHJI*. Codifica la subunidad b de la nitrato reductasa A, que funciona en anaerobiosis.

Figura C2.8.a. Esquema de la cascada de señalización en la que interviene la proteína NarH.

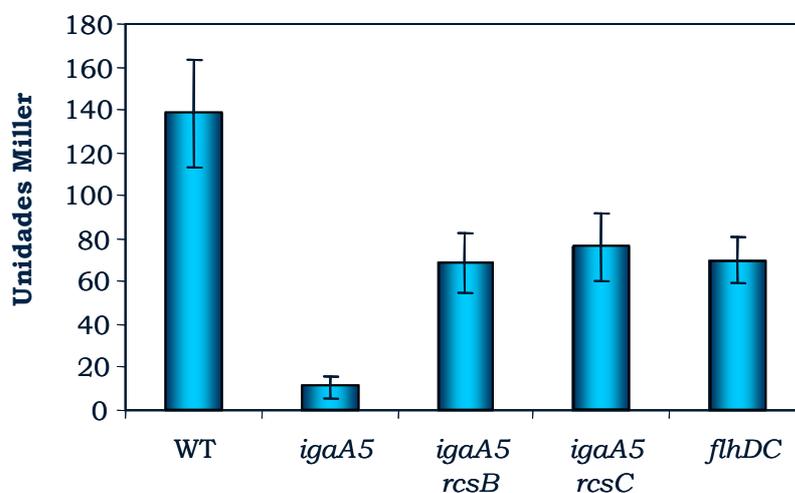
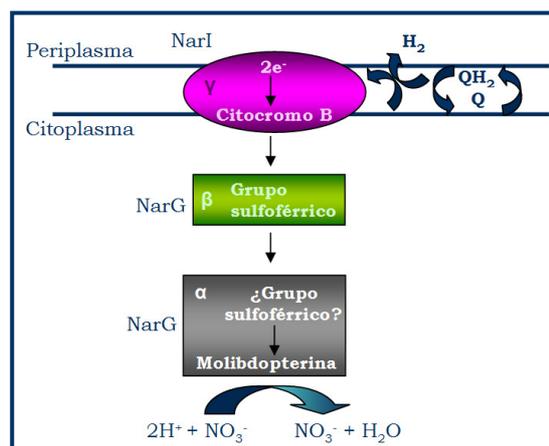


Figura C2.8.b. Actividad β-galactosidasa del gen *narH* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rcsB* o *rcsC*, y no parece estar muy regulado por *flhDC*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

g) *dcuB*

Este gen codifica un transportador anaeróbico, concretamente un antitransportador fumarato:malato. Forma parte de la unidad transcripcional *dcuB-fumB*. El homólogo de *fumB* en *E. coli* está regulado por RcsC (Ferrières y Clarke 2003). La identificación de *dcuB* y de *narH* en estos escrutinios sugiere una implicación de Rcs en el control del metabolismo anaerobio. De hecho, en *E. coli* se ha demostrado que los productos de los genes *flhDC*, regulados negativamente por RcsB, regulan una serie de genes involucrados en la respiración anaeróbica en *E. coli* (Pruss *et al.* 2003). Sin embargo, ni *narH* ni *dcuB* estaban entre los genes identificados en dicho estudio.

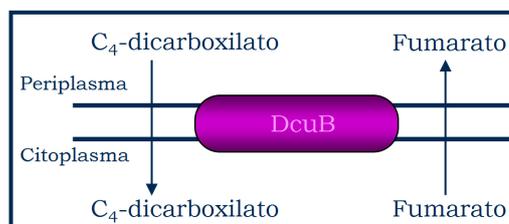


Figura C2.9.a. Esquema de la función de la proteína DcuB.

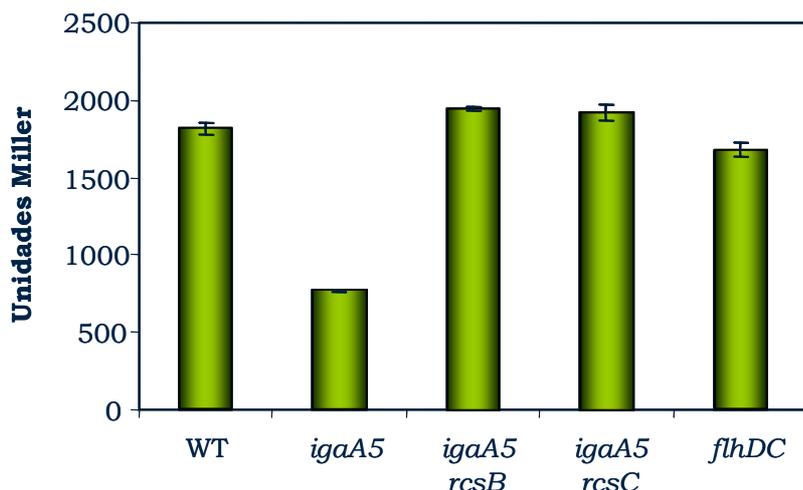


Figura C2.9.b. Actividad β -galactosidasa del gen *dcuB* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB* o *rscC*, y no se aprecia efecto de FlhDC. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

h) *melB*

Forma parte del operón *melAB*, y codifica un transportador de melibiosa acoplado al transporte de Na^+ , lo que otorga al sistema Rcs un posible papel en el metabolismo. Tiene un homólogo en *E. coli*, que no ha sido definido como miembro del regulón Rcs.

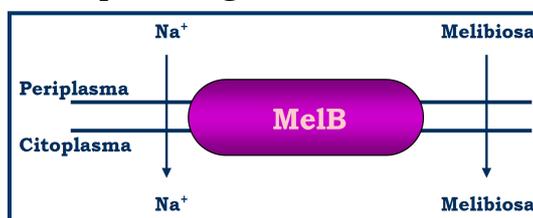


Figura C2.10.a. Esquema del papel de MelB.

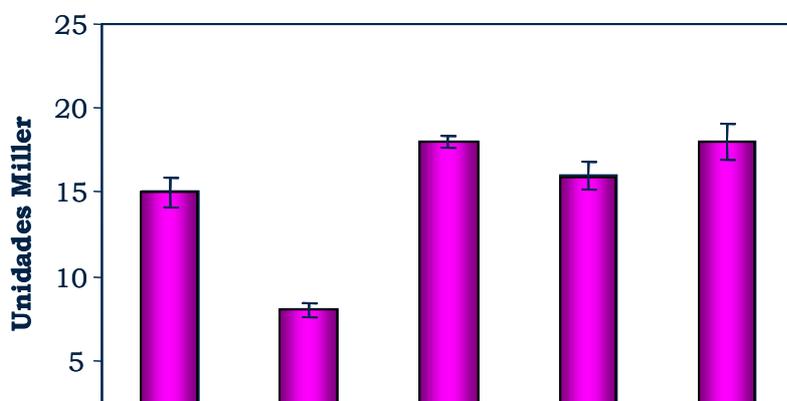


Figura C2.10.b. Actividad β -galactosidasa del gen *melB* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB* y *rscC*, pero no se aprecia efecto de *flhDC*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

i) *yhhJ*

Junto con *yhiH*, forma parte de una unidad transcripcional que codifica un transportador de la superfamilia ABC, y en el que YhhJ es el componente de membrana interna. Estos transportadores dependientes de ATP participan en muchos procesos fisiológicos, como la toma de nutrientes, la secreción de moléculas de señalización o toxinas y la resistencia a fármacos. Por tanto son capaces de transportar una gran variedad de sustratos (Schmitt y Tampe 2002).

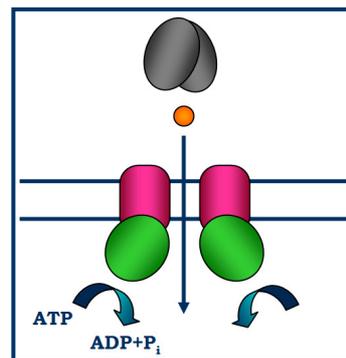


Figura C2.11.a. Papel de la proteína YhhJ como transportador.

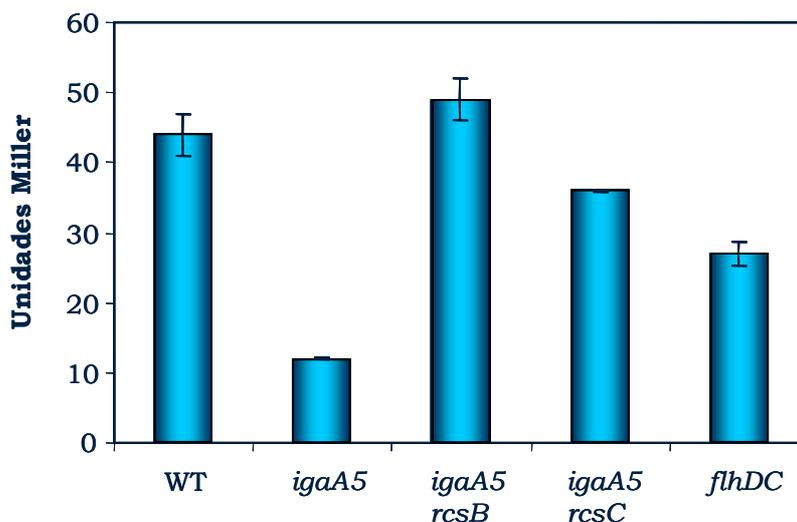


Figura C2.11.b. Actividad β -galactosidasa del gen *yhhJ* en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB* y *rscC*, y efecto parcial de *flhDC*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

j) STM1491

Es otro de los genes específicos de *Salmonella* encontrados en el escrutinio. Su producto podría ser el componente de unión a ATP de otro transportador de la superfamilia ABC. En este escrutinio se han detectado varios genes relacionados con el transporte de nutrientes y otras sustancias, lo que sugiere que el sistema Rcs debe tener algún tipo de relación con el metabolismo.

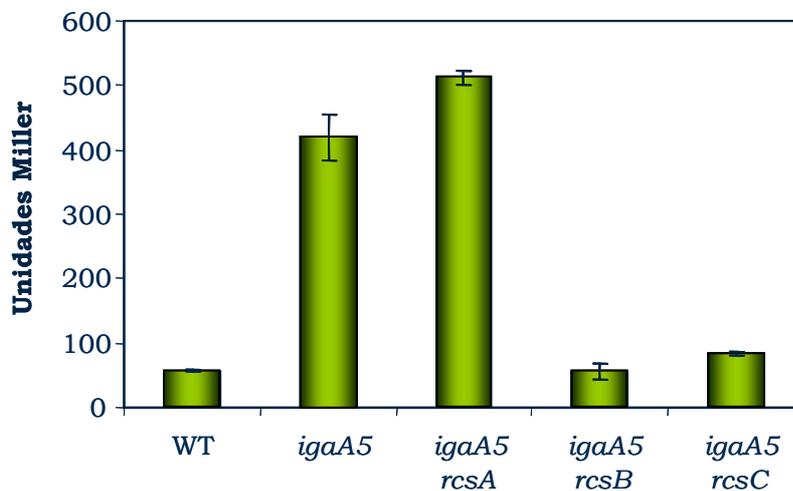


Figura C2.12. Actividad β -galactosidasa del gen STM1491 en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB* y *rscC*, y no se aprecia efecto de *rscA*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

k) STM2176

Es otro de los genes específicos de *Salmonella*. Forma parte de la unidad transcripcional STM2179-STM2178-STM2177-STM2176-STM2175. La función que hipotéticamente se le atribuye (modificaciones postraduccionales, transfiriendo radicales de azufre desde el glutatión) se basa en la similitud parcial de secuencia, ya que no existe homólogo en *E. coli*.

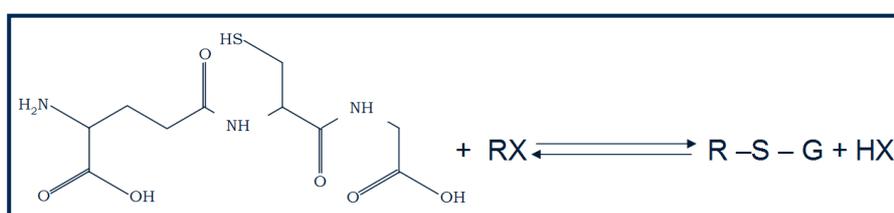


Figura C2.13.a. Hipotética reacción llevada a cabo por el producto del gen STM2176.

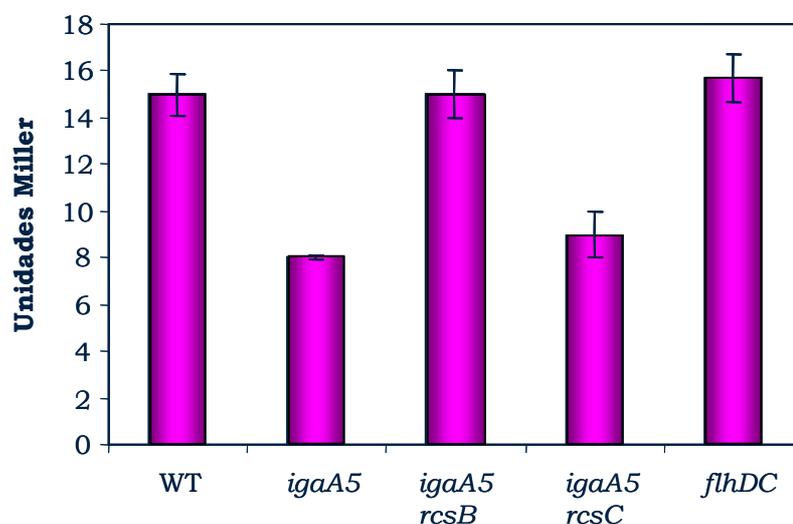


Figura C2.13.b. Actividad β -galactosidasa del gen STM2176 en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rscB*, y no se aprecia efecto de *flhDC* ni de *rscC*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

1) PSLT071

Es un gen específico de *Salmonella*, situado en el plásmido de virulencia pSLT (Jones *et al.* 1982, Parkhill *et al.* 2001). Es similar al gen 32 de R1 y a la ORF273 del plásmido F.

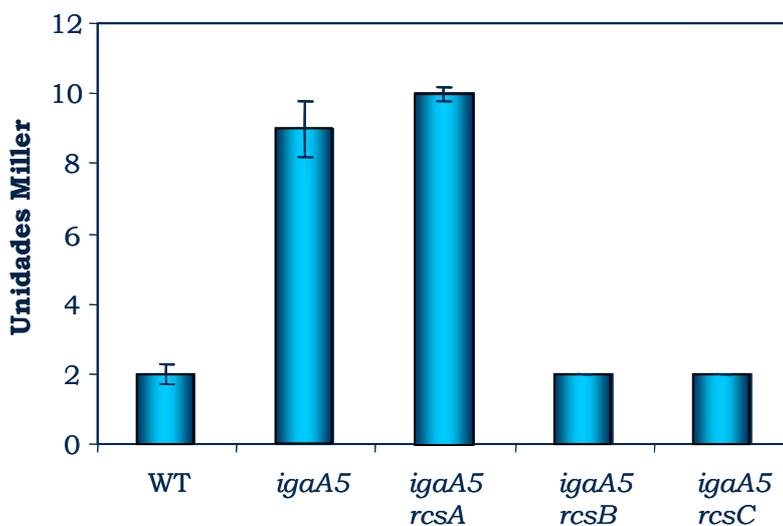


Figura C2.14. Actividad β -galactosidasa del gen PSLT071 en distintos fondos genéticos. Se observa supresión en fondo *rcsB* y *rscC*, y no se aprecia efecto de *rscA*. Los datos representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

Las actividades β -galactosidasa indican que todos estos genes están regulados, como se esperaba, tanto por RcsB como por RcsC. La única excepción es STM2176 cuya expresión parece ser independiente de RcsC. Por otra parte, se sabe que RcsA regula algunos de los genes del regulón Rcs pero no todos. Por ejemplo, RcsA regula los genes de la cápsula pero no los del flagelo (Cano et al. 2002). Los resultados de la tabla indican que una mutación *rscA* suprime parcialmente la sobreexpresión de *yjbH* en fondo *igaA5*. En cambio, no ejerce este efecto sobre STM1491 ni sobre *yiaD*. Se puede concluir que, entre los genes identificados en este trabajo, RcsA sólo regula algunos de los regulados positivamente por el sistema Rcs.

En cuanto a la regulación por FlhD/FlhC, *trg* está regulado positivamente, como era de esperar, ya que su producto está relacionado con la quimiotaxia. Para el resto de las fusiones, en algunos de los casos no se detecta ningún efecto, como en *dcuB*, *melB* y STM2176. En otros casos se observa un efecto parcial, como en *siiE*, *narH* y *yhhJ*.

2.5. Efecto de los genes identificados en el escrutinio sobre la virulencia de *Salmonella*

Un objetivo de este capítulo –ampliar nuestro conocimiento del regulón Rcs– se alcanzó con la identificación de 12 unidades transcripcionales cuya regulación por Rcs no había sido descrita previamente en *Salmonella*. Otro objetivo era tratar de entender la enorme atenuación de la virulencia que sufren los mutantes con activación constitutiva del sistema Rcs. En el Capítulo 1 ya se indicó que un factor que contribuía a la atenuación era la sobreexpresión de los genes de la cápsula de ácido colánico. Para determinar si los nuevos genes identificados contribuían al fenotipo de avirulencia de los mutantes

Rcs constitutivos, se calculó el índice de competitividad en ratones por vía intraperitoneal. Dado que nuestro escrutinio había proporcionado tanto genes activados como reprimidos por el sistema Rcs, se hicieron dos tipos de estudios. Para los genes reprimidos por RcsB, convenía comparar los mutantes con la estirpe silvestre, ya que se trataba de genes activos en ésta última (**Figura C2.15.a**). Se trataba, pues, de determinar si mutaciones en dichos genes atenuaban la virulencia. En cambio, para los genes activados por RcsB había que comparar la virulencia del mutante en fondo *rscC* constitutivo con la estirpe silvestre, ya que se trata de genes activos en fondo *rscC* (**Figura C2.15.b**). Es decir, se trataba de ver si la atenuación del mutante *rscC* constitutivo se debía a la sobreactivación de dichos genes. En ese caso, el doble mutante debería recuperar, al menos en parte, la virulencia.

Como se observa en las figuras, ninguno de los mutantes tiene efecto en la virulencia de *Salmonella*. Por tanto, en las condiciones ensayadas, estos genes no contribuyen a la atenuación de la virulencia de los mutantes *rscC* constitutivos. Sin embargo, hay que resaltar que según datos de la literatura antes mencionados, tanto *bapA* como *siiE* contribuyen a la virulencia de *Salmonella* por vía oral.

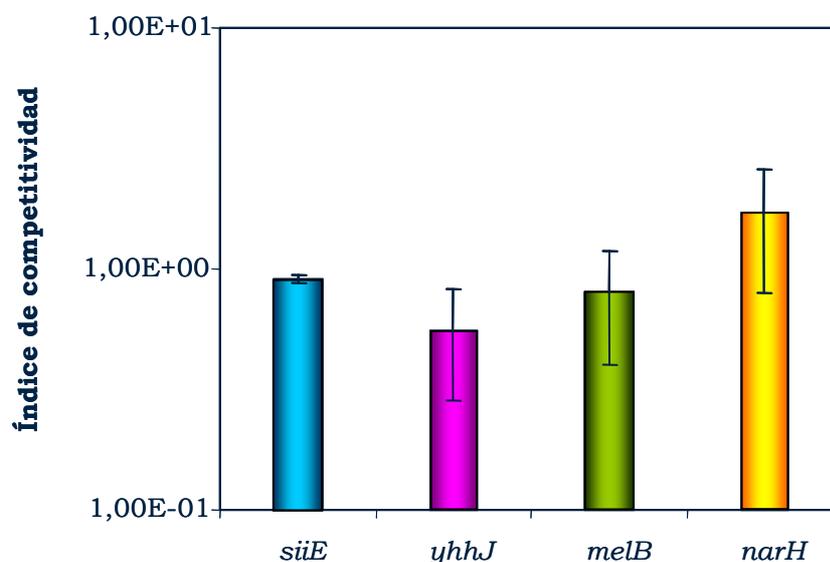


Figura C2.15.a. Virulencia de los mutantes reprimidos por RcsB encontrados en el escrutinio. Se calculó el índice de competitividad de cada candidato frente a la estirpe silvestre. Los índices obtenidos no difieren significativamente de 1. Los datos representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

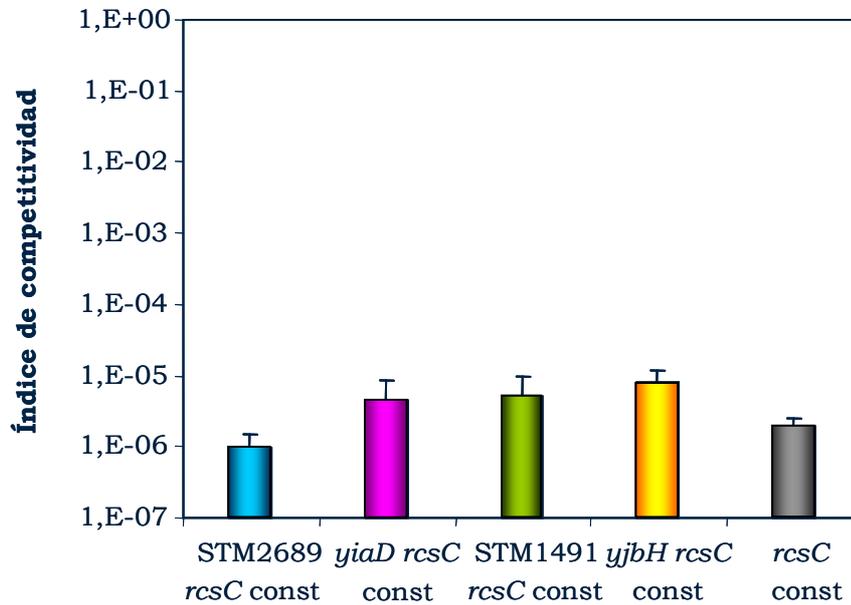


Figura C2.15.b. Virulencia de los mutantes activados por RcsB encontrados en el escrutinio. Se calculó el índice de competitividad de cada candidato en fondo *rcsC* constitutivo frente a la estirpe silvestre. Los valores obtenidos no tienen diferencias significativas con el valor del mutante *rcsC* constitutivo, es decir, una mutación en estos genes no suprime la atenuación del mutante *rcsC* constitutivo. Los datos representan la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

Capítulo 3

El operón *srfABC*

Entre los genes del regulón Rcs identificados en el capítulo anterior que no presentan homólogos en *E. coli* (y por tanto pueden haber sido adquiridos por transferencia horizontal), resultaban especialmente interesantes *srfA* y *srfB*, ambos pertenecientes al operón *srfABC*. Este operón se identificó en una búsqueda de genes regulados por SsrB que no estuvieran situados en la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Worley *et al.* 2000). Todos los nuevos genes identificados en aquel escrutinio se denominaron *srf* (por "SsrB regulated factor"). El sistema de dos componentes SsrAB regula positivamente la expresión de los genes necesarios para la síntesis del sistema de secreción de tipo III de la isla de patogenicidad 2 y de sus efectores (Hensel *et al.* 1995, Deiwick *et al.* 1999). Gran parte de los genes que codifican efectores están en la propia isla, pero puede haber otros en zonas no ligadas del cromosoma bacteriano. De ahí que se considerara a los productos Srf como candidatos a ser secretados mediante el sistema de secreción de la isla 2. El operón *srfABC*, aunque no existe en *E. coli*, está presente en *Enterobacter* y *Yersinia*. Además, el patógeno de plantas *Pseudomonas syringae* presenta un ortólogo de *srfC*, cuyo producto se secreta a través de un sistema de secreción tipo III (Petnicki-Ocwieja *et al.* 2002). Por todo ello decidimos llevar a cabo un estudio más profundo del operón *srf*.

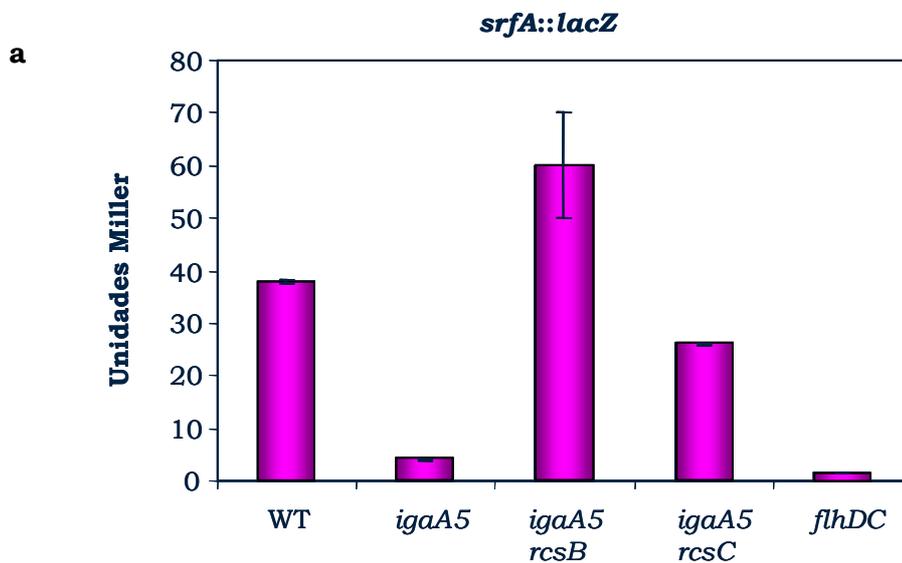
3.1. Los genes *srf* están regulados transcripcionalmente por el sistema Rcs

La existencia de regulación de los genes *srf* por el sistema Rcs se comprobó comparando la expresión de fusiones *sfr::lac* en fondos con baja y alta expresión del sistema Rcs: la estirpe silvestre y un mutante *igaA5*, respectivamente (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). También se estudió si la represión en fondo *igaA5* era suprimida por mutaciones en *rcsB* o *rcsC*. Además, se midió la expresión de las fusiones en un mutante *flhDC* (Macnab 1996), que regula muchos genes reprimidos por el sistema Rcs (Pruss *et al.* 2001, Pruss *et al.* 2003), entre los que se hallan genes de

la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (Wang *et al.* 2007). Los resultados se muestran en las **Figuras C3.1a** y **C3.1b**.

La regulación también se estudió a nivel de proteína. Para ello, cada una de las proteínas Srf fue etiquetada con el epitopo 3xFLAG. La mutagénesis dirigida se hizo usando los oligonucleótidos *srfA*-P1Flag, *srfA*-P2Flag, *srfB*-P1Flag, *srfB*-P2Flag, *srfC*-P1Flag y *srfC*-P2Flag. Hibridaciones western utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epitopo 3xFLAG permitieron detectar las proteínas Srf y estudiar su regulación (**Figura C3.2**).

Como se observa en las figuras **C3.1** y **C3.2**, los tres genes muestran una regulación muy clara por el sistema Rcs, ya que están fuertemente reprimidos por la sobreactivación de *rscB*, que es suprimida por una mutación en cualquiera de los genes *rscB* o *rscC*. Además, muestran regulación dependiente de *flhDC* e independiente de *fliA* (**Figuras C3.1** y **C3.2** y datos no mostrados), lo que es coherente con los datos de un artículo de otro grupo aparecido durante la realización de esta Tesis (Frye *et al.* 2006).



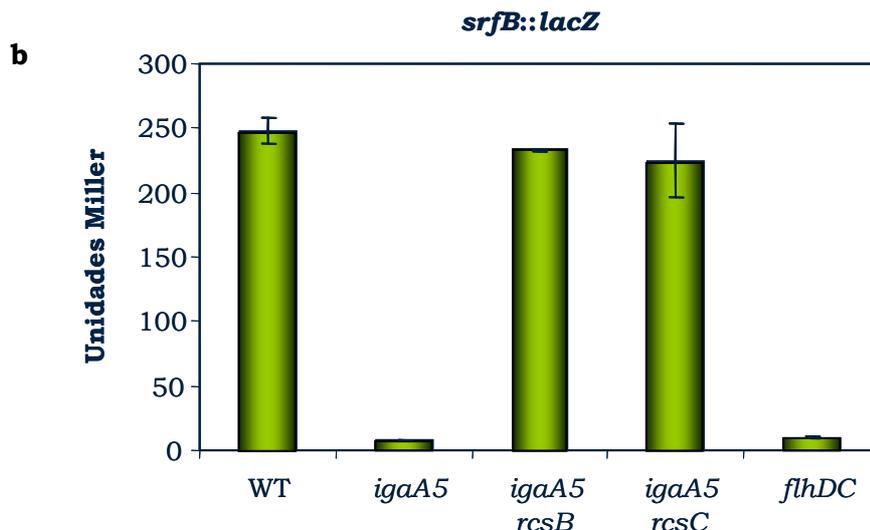


Figura C3.1. Regulación de los genes *srf* por el sistema Rcs. Tanto *srfA* (a) como *srfB* (b) muestran una regulación muy clara por el sistema Rcs, que es suprimida por una mutación en cualquiera de los genes *rscB* o *rscC*. Además, muestran una clara regulación por *flhDC*. Las figuras representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

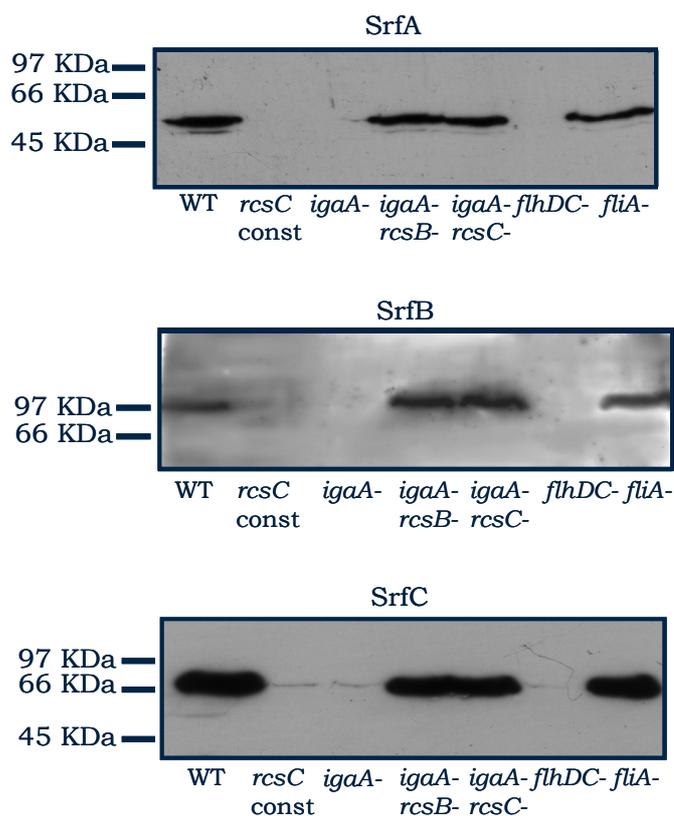


Figura C3.2. Regulación de los genes *srfA*, *srfB* y *srfC* por el sistema Rcs a nivel de proteína. Extractos de derivados de la estirpe silvestre 14028 que expresan las proteínas SrfA, SrfB o SrfC etiquetadas con 3xFLAG se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril. La inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Se obtuvieron los mismos resultados que con las fusiones transcripcionales.

3.2. Expresión diferencial de los genes *srf* según las condiciones de cultivo

Como se ha mencionado al inicio de este capítulo, los productos del operón *srfABC* eran candidatos a efectores del sistema de secreción de tipo III codificado por la isla de patogenicidad 2. Las herramientas de que disponíamos nos permitieron analizar esa hipótesis estudiando la posible secreción a medios de cultivo en condiciones de expresión del sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 2. No fue posible detectar secreción de ninguna de las tres proteínas etiquetadas. Estos resultados negativos nos llevaron a plantear un estudio en profundidad del patrón de expresión de estos genes, teniendo en cuenta por un lado los datos de la literatura, y por otra parte que *Salmonella* posee otro sistema de secreción de tipo III implicado en la virulencia. Dicho sistema está codificado en la isla de patogenicidad 1, y tiene un patrón de expresión opuesto al del sistema codificado en la isla de patogenicidad 2, todo ello bajo el control del sistema regulador de dos componentes PhoPQ (véase el esquema).

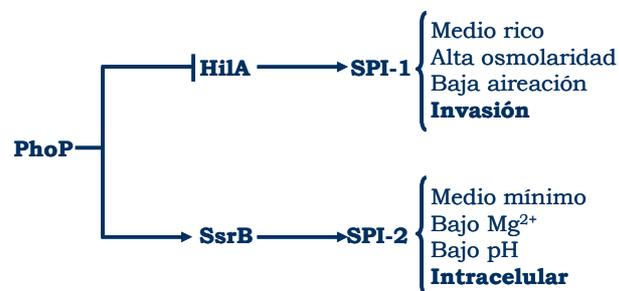


Figura C3.3. Esquema simplificado de la regulación de las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2 (SPI-2). PhoP regula negativamente a la SPI-1 a través del regulador HilA y negativamente a SPI-2 a través de SsrB. PhoP se activa en el ambiente intracelular o en un medio que imita dicho ambiente (mínimo, bajo Mg²⁺, bajo pH). PhoP no está activo en condiciones de invasión (medio rico con alta osmolaridad y baja aireación).

Se había descrito que los genes *srfABC* estaban regulados por SsrAB, el regulador general de la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (Worley *et al.* 2000). Según eso, debían tener mayor expresión en condiciones de activación de la isla 2 y debían estar reprimidos en las

condiciones de expresión de la isla 1. Para examinar esta hipótesis se midió la expresión de una fusión *srfB::lacZ* en condiciones de activación de la isla 1 o "invasivas" (medio rico, LB (Bajaj *et al.* 1996)) y de la isla 2 o imitadoras del ambiente intravacuolar de la célula eucariótica (medio mínimo con baja concentración de magnesio y pH ácido, LPM (Deiwick *et al.* 1999, Lee *et al.* 2000)). Se probó también medio LB suplementado con EDTA, ya que la disminución en la concentración de Mg^{2+} producida por el quelante sirve de señal de activación del sistema PhoPQ. Además se analizó la expresión de *srfB* en diversos fondos genéticos, gracias a la disponibilidad de mutaciones en los reguladores generales de cada una de las islas (*hilA* (Bajaj *et al.* 1995) y *ssrB* (Hensel *et al.* 1995, Deiwick *et al.* 1999)) y en el regulador general de ambas (*phoP* (Miller y Mekalanos 1990, Bijlsma y Groisman 2005)). Para este último se usó tanto una mutación nula en *phoP* como una mutación que daba lugar a activación constitutiva del sistema PhoPQ (mutación *pho-24*). Como controles se usaron fusiones *lacZ* en un gen de la isla 1, *prgH*, y uno de la isla 2, *ssaV*, y se midieron actividades β -galactosidasa en las mismas condiciones de cultivo y en los mismos fondos genéticos. Los resultados se presentan en la **Figura C3.4**.

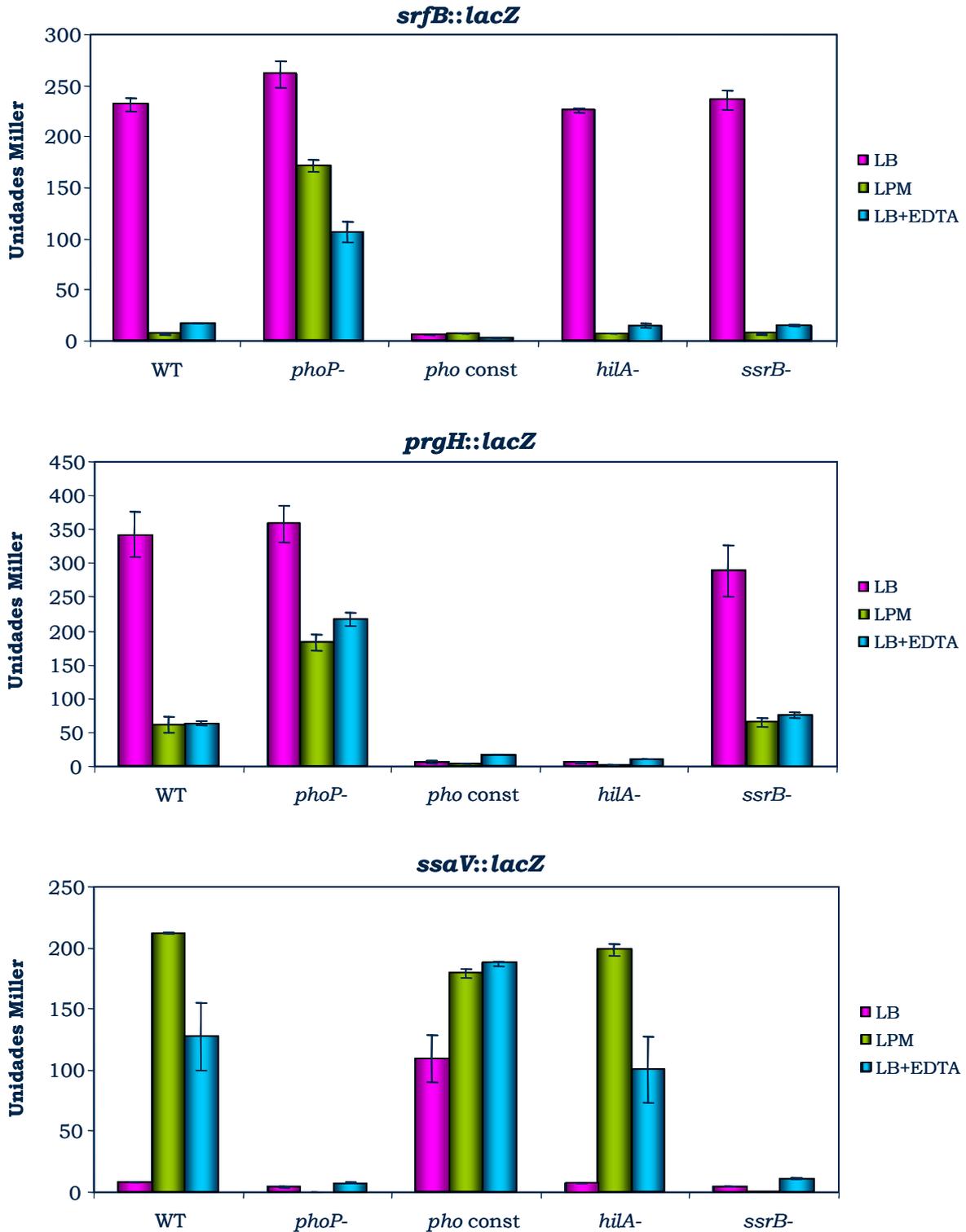


Figura C3.4. Represión transcripcional de *srfABC* por PhoPQ. Los niveles de expresión de *srfB*, *prgH* y *ssaV* se midieron mediante fusiones transcripcionales *lacZ*. Las estirpes con las mutaciones indicadas se cultivaron en los siguientes medios: medio LB para la inducción de la SPI-1; LPM para la inducción de la SPI-2; y medio LB con EDTA para la quelación de Mg²⁺. Las actividades β-galactosidasa mostradas corresponden a cultivos en fase estacionaria, pero se obtuvieron resultados similares en fase exponencial. Las gráficas representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

Los datos indican que el sistema PhoPQ reprime al operón *srfABC*, de manera similar a lo que ocurre con los genes de la isla de patogenicidad 1 (ej., *prgH*). A diferencia de éstos, sin embargo, el operón *srfABC* no está regulado por HilA. Por otro lado, sorprendentemente, no se observa regulación alguna por SsrB pese a lo publicado previamente (Worley *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos por medidas de actividad β -galactosidasa se confirmaron mediante hibridaciones western. Se prepararon extractos totales de proteínas a partir de cultivos de la estirpe silvestre, el mutante *phoP* y el mutante constitutivo *pho-24* en los diferentes medios. Con ellos se hizo hibridación western con anticuerpo anti-FLAG. Los resultados obtenidos para SrfC se muestran en la **Figura C3.5**. Se observa el mismo patrón de regulación observado para el gen *srfB* a nivel transcripcional. Con las proteínas SrfA y SrfB se obtuvieron resultados análogos.

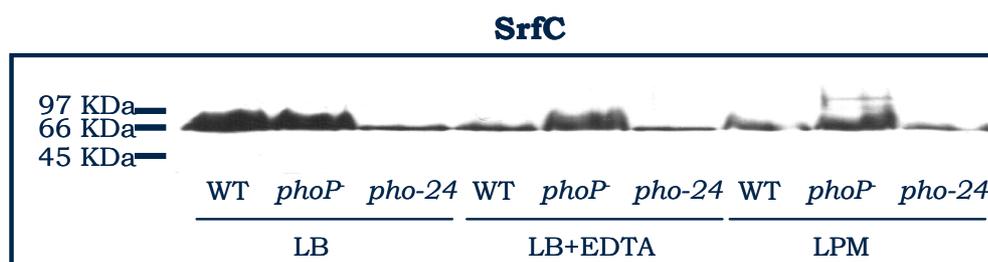


Figura C3.5. Regulación de los niveles de SrfC-3xFLAG por PhoP. Las estirpes con las mutaciones indicadas se cultivaron en medio LB (para la inducción de la SPI-1), LPM (para la inducción de la SPI-2) y medio LB con EDTA (para la quelación de Mg^{2+}). Los extractos de proteína se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%. En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína total. Para la detección se usó el anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

3.3. Secreción de las proteínas SrfA, SrfB y SrfC

Visto el patrón de expresión del operón *srfABC*, y aunque la literatura dijera lo contrario, no tenía sentido esperar que los productos de este operón se secretaran a través del sistema de secreción de tipo III codificado en la isla de patogenicidad 2, puesto que el operón no se expresa en las condiciones en que lo hace dicho sistema de secreción. En cambio, parecía sensato investigar la secreción de estas proteínas a

través del sistema codificado por la isla de patogenicidad 1. Con este planteamiento, se realizaron experimentos de secreción utilizando las estirpes etiquetadas con epitopo 3xFLAG en las proteínas SrfA, SrfB y SrfC. Como control se usó la proteína SlrP etiquetada con el mismo epitopo. Esta proteína es un efector tanto del sistema de secreción codificado por la isla 1 como del codificado por la isla 2 (Miao y Miller 2000). Los experimentos se llevaron a cabo en la estirpe silvestre y en mutantes de sistemas de secreción tipo III. Debido a que los diversos sistemas de secreción tipo III presentes en la bacteria son muy parecidos, puede ocurrir que la falta de un componente de un aparato sea suplida por un componente del otro aparato de secreción (Hueck 1998, Beuzón *et al.* 2001, Hautefort *et al.* 2008). Para eliminar esta posibilidad se construyó un mutante carente de los tres sistemas de secreción tipo III presentes en *Salmonella*, es decir, *prgH* (isla 1) *ssaV* (isla 2) y *flhA* (flagelo). En la **Figura C3.6** se presenta una comparación de la secreción de proteínas Srf en la estirpe silvestre y en el triple mutante. Se observa que la única proteína que se secreta por este mecanismo es SrfC. Sus niveles de secreción son menores que los detectados para SlrP (datos no mostrados). Ello puede indicar que cada proteína efectora tiene una tasa de secreción propia.

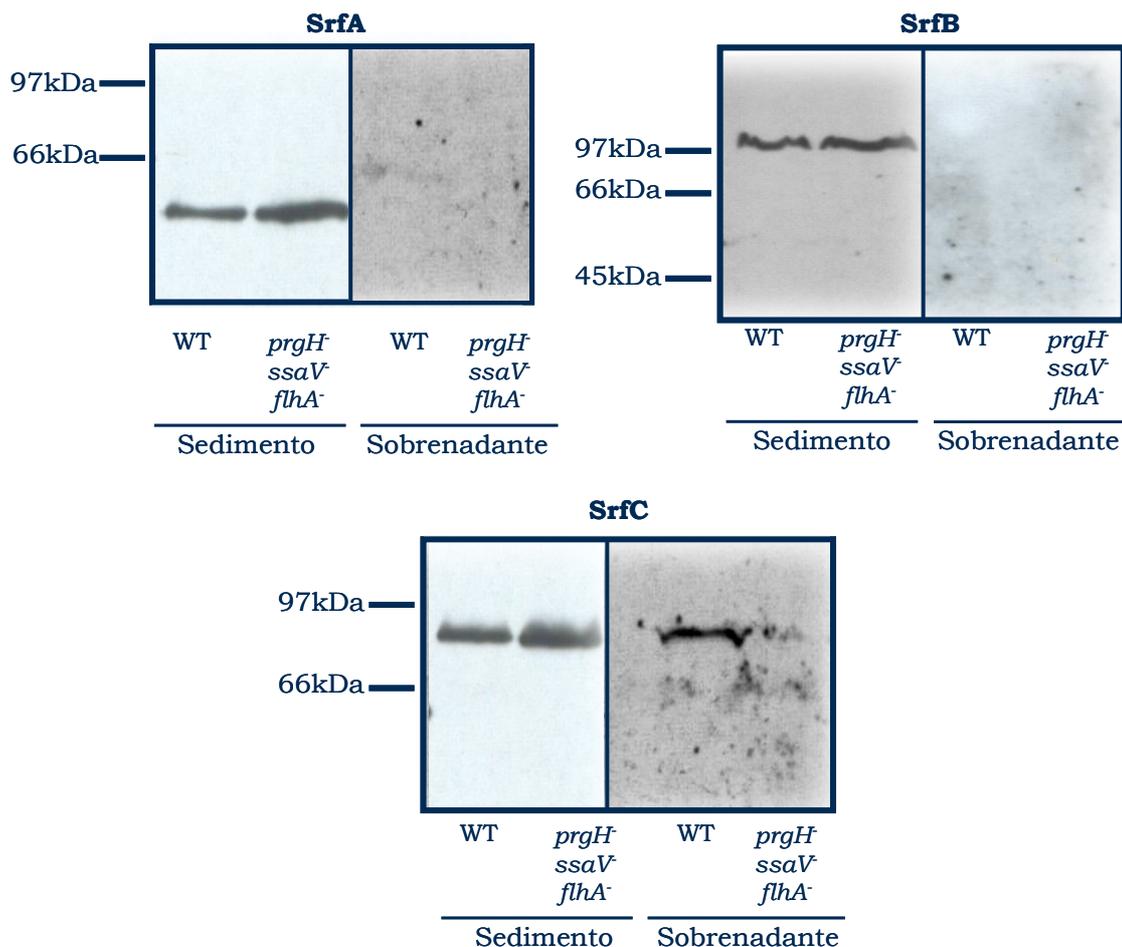


Figura C3.6. Ensayo de secreción de las proteínas Srf. Se centrifugan cultivos en LB de la estirpe silvestre y del triple mutante carente de sistemas de secreción tipo III y se precipitan las proteínas presentes en el sobrenadante. Como control se toma una alícuota del sedimento. Se hace una separación electroforética en un gel de acrilamida al 10% y se realiza hibridación western con anticuerpo anti-FLAG. Sólo se observa proteína secretada en el caso de SrfC.

3.4. Ensayos de virulencia del operón *srfABC*

Como se ha indicado anteriormente, un objetivo de esta Tesis era tratar de entender la enorme atenuación de la virulencia que sufren los mutantes con activación constitutiva del sistema Rcs. De ahí que se estudiara el efecto de los genes *srfABC* en el modelo de ratón, calculando el índice de competitividad por vía intraperitoneal de los mutantes *srfA* y *srfB* frente a la estirpe silvestre. No se midió el índice de competitividad del mutante *srfC* ya que las mutaciones en *srfA* y *srfB* son polares sobre *srfC*, lo que significa que un mutante *srfA* o *srfB* es también *srfC*. Como se observa en la **Figura C3.7**, ninguno de los dos genes tiene efecto en la

virulencia de *Salmonella* en las condiciones ensayadas. El índice de competitividad de los dos mutantes se halla entre 1 y 2. Es decir, los mutantes son prácticamente igual de virulentos que la estirpe silvestre.

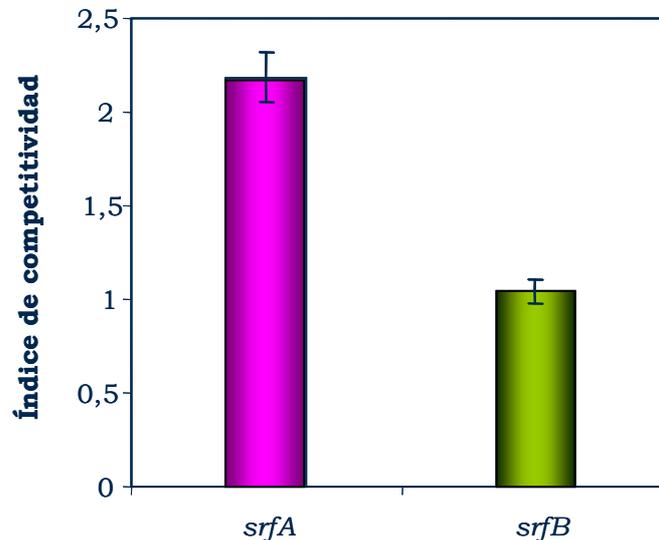


Figura C3.7. Ensayos de virulencia de los genes *srfA* y *srfB*. Se calculó el índice de competitividad de cada gen *srf* frente a la estirpe silvestre por vía intraperitoneal. Los valores representan la media y la varianza de al menos tres experimentos independientes.

3.5. Solapamiento parcial entre los regulones Rcs y PhoPQ

El hecho de que el operón *srfABC* estuviera regulado simultáneamente por el sistema Rcs y por el sistema PhoPQ sugería que tal vez hubiera una interacción genética más amplia entre estos sistemas reguladores de dos componentes. Dado que ambos sistemas regulan la virulencia de *Salmonella* (Fields *et al.* 1989, García-Calderón *et al.* 2005), su posible interacción funcional se investigó usando el modelo de infección de ratones. Ratones BALB/c se inocularon por vía intraperitoneal con una mezcla formada por un mutante simple en uno de estos sistemas y el mutante doble en ambos sistemas de dos componentes. De este modo se puede cuantificar la contribución que cada sistema aporta a la virulencia (Beuzón y Holden 2001). Si ambos genes contribuyen de forma independiente a la virulencia de *Salmonella*, el índice de competitividad debe ser igual al índice de competitividad de cada mutante simple con respecto a la estirpe silvestre. Sin embargo, si

ambos genes están relacionados entre sí y participan en la misma función relacionada con la virulencia, el índice de competitividad será igual a 1. La tercera posibilidad es que ambos genes participen en funciones de virulencia comunes, pero también en otras independientes. En este caso, el índice de competitividad será mayor que el del mutante simple respecto a la estirpe silvestre, pero menor que 1. Como se observa en la **Figura C3.8**, el índice de competitividad de los mutantes dobles frente a los mutantes simples tiene un valor intermedio entre 1 y el del correspondiente mutante simple frente a la estirpe silvestre. Estos resultados sugieren un solapamiento parcial entre Rcs y PhoPQ en el control de las funciones de virulencia.

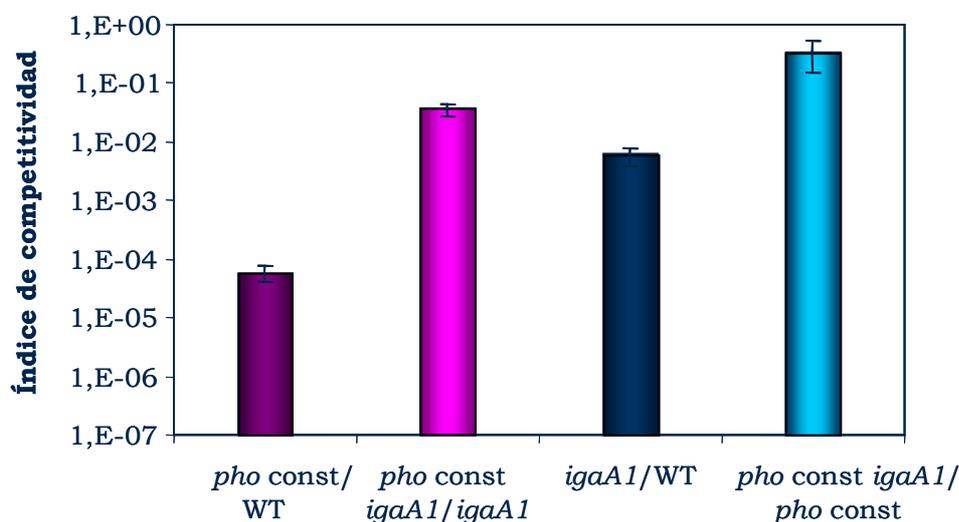


Figura C3.8. Solapamiento de los sistemas Rcs y PhoPQ en el control de la virulencia. Se representan las medias y desviaciones típicas de los índices de competitividad por vía intraperitoneal entre las estirpes cuyo genotipo se indica. Los índices de competitividad de los mutantes dobles frente a los simples son significativamente distintos de 1 y de los índices de competitividad de los correspondientes mutantes simples ($P < 0,05$). Los resultados proceden de 3 experimentos como mínimo.

Para tener más pruebas del solapamiento parcial de las funciones de virulencia entre los sistemas Rcs y PhoPQ, se comparó la expresión de tres genes representativos, *prgH* (isla 1), *ssaV* (isla 2) y *gmm* (gen de la cápsula) en fondos RcsC constitutivo y PhoP constitutivo. Hay que tener en cuenta que los sistemas de secreción codificados por ambas islas son

imprescindibles para distintos pasos de la infección (invasión y supervivencia intracelular, respectivamente) y que la sobreexpresión de cápsula de ácido colánico es uno de los factores que contribuyen a la atenuación de un mutante Rcs constitutivo, como se indicó en el capítulo 1. Los resultados se muestran en la **Figura C3.9**. El gen *prgH* está reprimido transcripcionalmente tanto por el sistema Rcs como por PhoPQ. Ello está en consonancia con resultados recientes de otro grupo que sugieren que el sistema Rcs controla negativamente la invasión de células epiteliales por *Salmonella* (Mouslim *et al.* 2004). Sin embargo, *ssaV* está regulado por el sistema PhoPQ y no por Rcs, mientras que *gmm* sólo está regulado por Rcs. En conjunto, los resultados de este apartado apoyan el solapamiento parcial de los regulones Rcs y PhoPQ en el control de la virulencia de *Salmonella*.

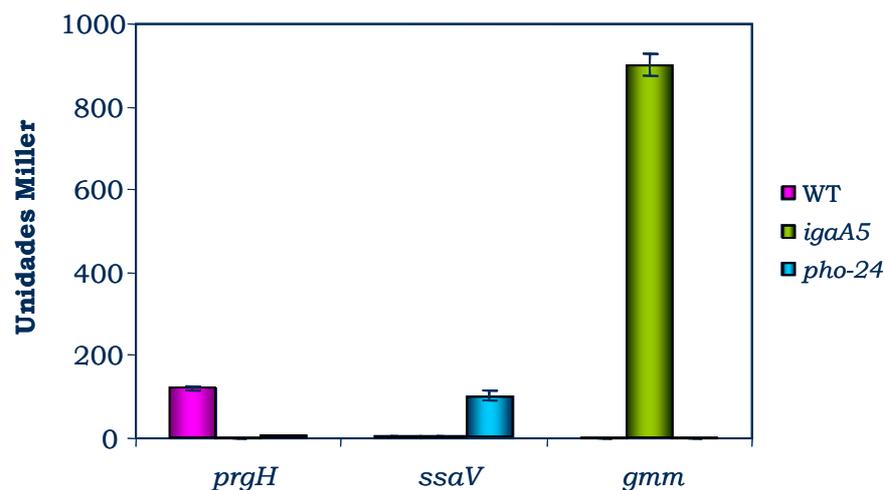


Figura C3.9. Regulación transcripcional de genes relacionados con la virulencia de *Salmonella* por los sistemas Rcs y PhoPQ. Se observa un solapamiento parcial en la regulación de estos genes. Hay genes regulados por ambos sistemas, otros regulados sólo por Rcs y otros regulados sólo por PhoPQ. Los datos representan la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

Capítulo 4

El gen *igaA*

Estudios previos en nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Francisco García del Portillo habían llevado a la identificación del gen *igaA* (Cano *et al.* 2001), también llamado *mucM* (Costa y Antón 2001). Este gen tiene homólogos en *Escherichia coli* (*yrfF*) y en *Proteus mirabilis* (*umoB*). Se trata de un gen esencial que codifica una proteína de membrana, y fue identificado en un mutante viable capaz de proliferar en fibroblastos en cultivo: de ahí que recibiera el nombre de *igaA* (“intracellular growth attenuator A”). Muchos mutantes *igaA* puntuales son mucosos, avirulentos en ensayos en ratón (Cano *et al.* 2001) e inmóviles (Cano *et al.* 2002). Los fenotipos descritos para los mutantes viables *igaA* son idénticos a los que se observan en mutantes *rscC* constitutivos (García-Calderón *et al.* 2005). Por otra parte, los fenotipos de los mutantes *igaA* son suprimidos por mutaciones en los genes *rscB*, *rscC* o *rscD* (Cano *et al.* 2002). Se ha propuesto un modelo según el cual la función de *igaA* consiste en reprimir postraduccionalmente la actividad de la ruta de señalización RcsC-RcsD-RcsB (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Con estos antecedentes, uno de los objetivos de esta Tesis fue el estudio del gen *igaA* como un elemento clave en la regulación de la actividad del sistema Rcs.

4.1. Análisis molecular del gen *igaA*

a) Determinación del punto de inicio de la transcripción

La identificación del promotor de un gen puede facilitar la búsqueda de secuencias de unión de posibles reguladores. Para determinar el punto de inicio de la transcripción de *igaA* se usó el procedimiento estándar de extensión de un cebador (“primer extension”) (Manzanera *et al.* 2001). Para ello se amplificó, empleando los oligonucleótidos *igaA*pro5’ e *igaA*pro3’, un fragmento que contenía la posible región reguladora del gen *igaA* y parte de la secuencia codificante. El fragmento resultante se clonó en pIC552. El plásmido resultante, pIZ1586, porta una fusión transcripcional *igaA::lacZ*. Medidas preliminares de actividad β -galactosidasa indicaron que la secuencia

clonada era suficiente para la expresión de *igaA*. El ARN para la extensión del cebador se obtuvo de cultivos en LB de ATCC 14028/pIZ1586, y se usó como molde en extensiones con transcriptasa inversa, empleando el oligonucleótido cebador *igaA*pro3' marcado con [γ - 32 P]-ATP. Este mismo oligonucleótido se usó para hacer reacciones de secuenciación sobre el plásmido pIZ1586. Los resultados se presentan en la **Figura C4.1**. El punto de inicio de la transcripción resultó ser una C situada 125 bases corriente arriba del codón AUG iniciador. A partir del inicio de la transcripción se infieren las regiones -10 y -35, cuyas secuencias están muy próximas a los consensos descritos para los promotores dependientes de σ^{70} .

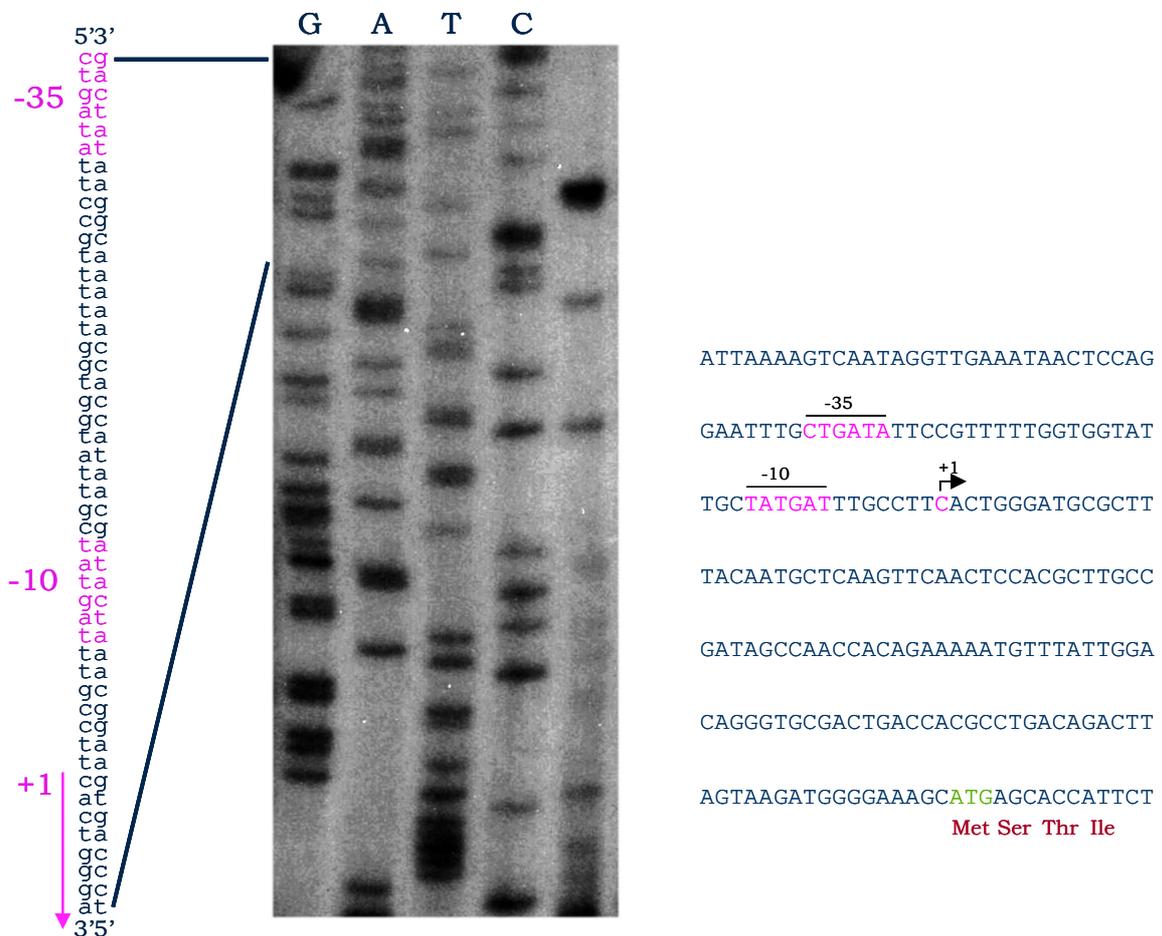


Figura C4.1. Determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen *igaA*. Los carriles de la secuenciación están marcados como G, A, T y C. Se usaron como molde 25 μ g de ARN total extraído de la estirpe ATCC 14028/pIZ1586. Las extensiones se hicieron a partir del oligonucleótido *igaA*pro3', complementario al extremo 3' del ARN de *igaA*. La reacción de secuenciación se realizó sobre el ADN extraído de DH5 α /pIZ1586 con el mismo oligonucleótido. Se muestra la secuencia próxima al inicio de la zona codificante de *igaA*, resaltando el punto de inicio de la transcripción, el triplete de inicio de la traducción y los posibles consensos para el factor σ^{70} de la ARN polimerasa (-10 y -35).

b) Dependencia de RpoD en la transcripción de *igaA*

Para confirmar la predicción de que la transcripción de *igaA* dependía de σ^{70} , se utilizó el mismo plásmido pIZ1586 descrito en el apartado anterior. Para comparar la expresión de la fusión *igaA::lacZ* de pIZ1586 en fondos *rpoD*⁺ y *rpoD*, pIZ1586 fue introducido en la estirpe UQ285 de *Escherichia coli*, portadora de un alelo termosensible de *rpoD* (una mutación nula *rpoD* es letal). La expresión de la fusión se comparó a temperatura permisiva (37°C) y restrictiva (42°C). Para ello, un cultivo exponencial a 37°C en LB con ampicilina se dividió en dos partes, una de las cuales se siguió incubando a temperatura permisiva mientras que la otra se trasladó a 42°C. Cada 30 minutos se extrajeron alícuotas y se midieron actividades β -galactosidasa. Como control se usó una fusión *traJ::lacZ* (construida igualmente en pIC552), ya que el gen *traJ* es dependiente de RpoD. Como se observa en la **Figura C4.2**, la expresión de ambos genes depende de RpoD: cuando los cultivos se pasan a temperatura restrictiva, la expresión de ambas fusiones disminuye progresivamente, mientras que a temperatura permisiva la cantidad de β -galactosidasa sigue aumentando.

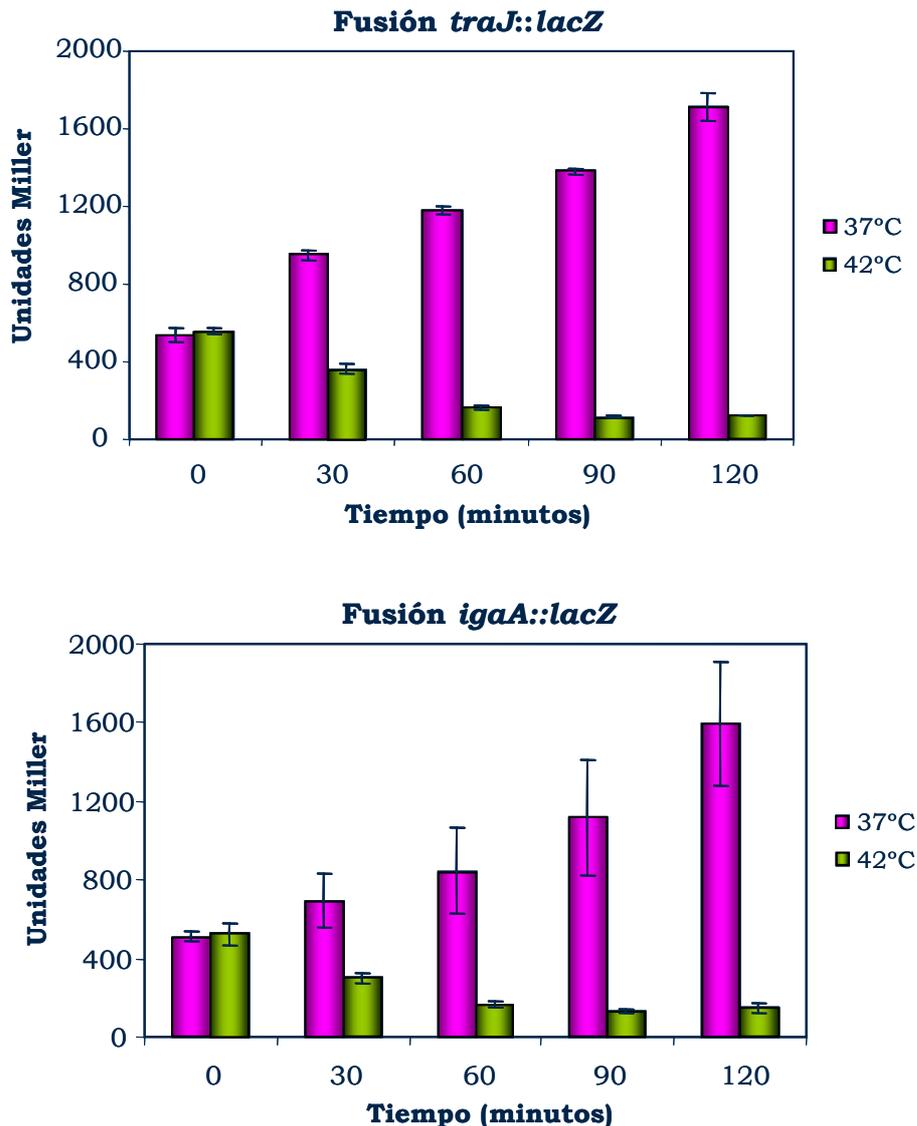


Figura C4.2. La transcripción de *igaA* depende de RpoD. La estirpe *E. coli* UQ285/pIZ1586 se cultivó hasta fase estacionaria. Tras dilución, se hicieron dos cultivos paralelos a 37°C hasta llegar a fase exponencial. En ese momento (tiempo 0) uno de los cultivos se mantuvo a 37°C y el otro se pasó a 42°C. Se representa la actividad β -galactosidasa de los cultivos a los tiempos indicados. La fusión *traJ* (panel superior) sirve de control del experimento. Los datos representan la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

c) Estudio de la unidad transcripcional de *igaA*

El gen *igaA* está anotado como *yrfF* en la secuencia completa del genoma de la estirpe LT2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Se encuentra flanqueado por el gen *nudE* (antes llamado *yrfE*), que se transcribe en sentido opuesto, y por el gen *yrfG*. Los genes contiguos *yrfG*, *yrfH* y *hslO* (*yrfI*) se transcriben en el mismo sentido que *igaA*

(Figura C4.3.a). El análisis de esta región con el algoritmo OperonDB (<http://www.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operons/operons.cgi>; (Ermolaeva *et al.* 2001)) sugiere que *igaA* puede ser el primer gen de un operón que incluiría a *yrfG*, *yrfH* y *hslO*. Esta predicción está basada en codireccionalidad de la transcripción, distancia entre genes y conservación en otros genomas. El programa indica que estos cuatro genes están dispuestos de manera consecutiva en la misma cadena de ADN en otros 15 genomas de secuencia conocida. Dichos genomas pertenecen a especies de los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia* y *Photorhabdus*. El programa informático da un 86% de confianza a la conclusión de que estos cuatro genes pertenecen a la misma unidad transcripcional. Para someter esta hipótesis a análisis experimental se realizó retrotranscripción y PCR (RT-PCR) usando cuatro parejas de oligonucleótidos. En todas las parejas el oligonucleótido 5' (*igaA5'*) correspondía al primer gen del posible operón, mientras que los oligonucleótidos 3' eran específicos de cada uno de los genes candidatos a formar parte del mismo (*igaA-STOP*, *yrfG5'*, *yrfH5'* o *yrfI5'*), (Gupta 1999) **(Figura C4.3.a)**. La eficacia de los oligonucleótidos se probó realizando ensayos de amplificación directamente sobre ADN genómico **(Figura C4.3.b)**. Para las RT-PCR se trató una muestra de ARN de la estirpe silvestre con Turbo ADNasa de Applied Biosystems. Tras este tratamiento se realizó una retrotranscripción con oligonucleótidos aleatorios, y una PCR posterior con las cuatro parejas de oligonucleótidos descritas **(Figura C4.3.a)**. En los cuatro casos se observa un producto de amplificación del tamaño esperado **(Figura C4.3.b)**. Para descartar un posible artefacto debido a contaminación por ADN (ej., debido a ineficacia del tratamiento con ADNasa), una parte de la muestra se trató con ARNasa H tras el tratamiento con Turbo ADNasa, y se sometió a retrotranscripción y PCR. En ese caso no se observó amplificación **(Figura C4.3.b)**. En resumen, los datos de la **Figura C4.3** apoyan la idea de que los genes *igaA*, *yrfG*, *yrfH* y *hslO* forman un operón.

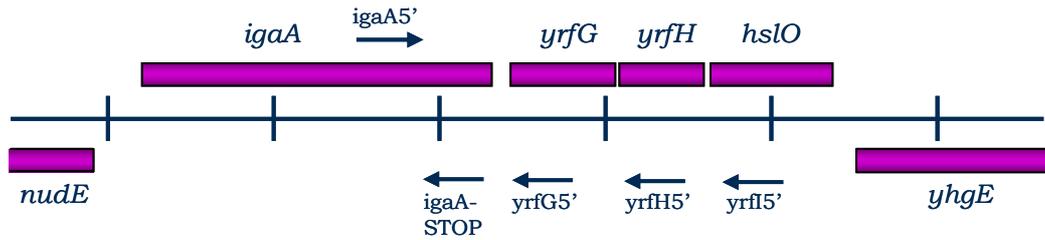


Figura C4.3.a. Organización de la región que contiene al gen *igaA* en el cromosoma de *Salmonella*. Los genes se han nombrado de acuerdo con la anotación de la entrada NC_003197 de GenBank en NCBI, excepto *igaA*, que aparece anotado como *yrfF*. La distancia entre dos líneas verticales representa 1 kb. La región codificante de *igaA* (*yrfF*) comienza en la posición 3650187, y la de *yrfI* acaba en la posición 3654367 en la secuencia de LT2. Las flechas indican la posición y orientación de los cebadores.

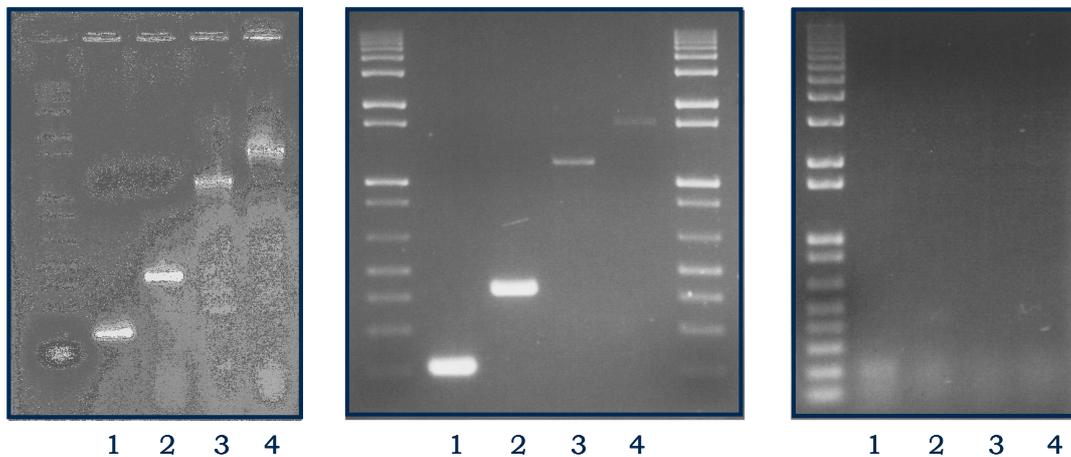


Figura C4.3.b. *igaA* es el primer gen de un operón. En el primer panel se muestra una electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos tras PCR con un molde de ADN genómico. 1, cebadores *igaA5'* e *igaA-STOP*; 2, cebadores *igaA5'* y *yrfG5'*; 3, cebadores *igaA5'* y *yrfH5'*; 4, cebadores *igaA5'* y *yrfI5'*. En el panel central se muestra una electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos con los mismos cebadores que en el caso anterior. En el panel de la derecha se muestra una RT-PCR realizada sobre ARN previamente tratado con ARNasa H; no se observan productos. El marcador de pesos moleculares es la escalera de 1 kb (Life Technologies). Los tamaños esperados de los productos de amplificación son 202 pb, 422 pb, 1155 pb, 1621 pb, respectivamente.

4.2. Búsqueda de reguladores de *igaA*

En un intento de identificar genes reguladores de la expresión de *igaA* diseñamos dos escrutinios genéticos basados en fusiones cromosómicas *igaA::lacZ*. El primer escrutinio empleó una fusión transcripcional y el segundo, una fusión traduccional. Ambos tipos de fusiones generan alelos nulos (y por tanto letales) de *igaA*. Para evitar la

letalidad, las fusiones se contruyeron en un mutante *rcsB* (Cano *et al.* 2002). La expresión de las fusiones se cuantificó haciendo medidas de actividad β -galactosidasa.

Para llevar a cabo los escrutinios, primero se mutagenizó la estirpe silvestre con el transposón defectivo *Tn10dTc*. Con las colonias resistentes a tetraciclina se prepararon colecciones (“pools”), cada una formada por 4.500 inserciones independientes. Estas colecciones se emplearon como donadoras en experimentos de transducción mediada por P22, usando como receptora la estirpe *rcsB* portadora de la fusión *igaA::lacZ* correspondiente (transcripcional o traduccional). Los transductantes se seleccionaron en LB-tetraciclina o medio mínimo-tetraciclina (resistencia asociada al transposón defectivo). Ambos medios contenían también kanamicina (resistencia asociada a la fusión *lac*) y X-gal (indicador cromogénico de la actividad de la fusión). Se buscaron represores de *igaA* (colonias más azules en presencia de X-gal) y activadores de *igaA* (colonias blancas). Los candidatos se reconstruyeron transduciendo el elemento *Tn10dTc* a la estirpe original, con objeto de determinar si el fenotipo observado estaba ligado a la inserción. Para determinar si las diferencias observadas en placas eran reales y para cuantificar las posibles diferencias, se realizaron medidas de actividad β -galactosidasa. El proceso se esquematiza en la **Figura C4.4**.

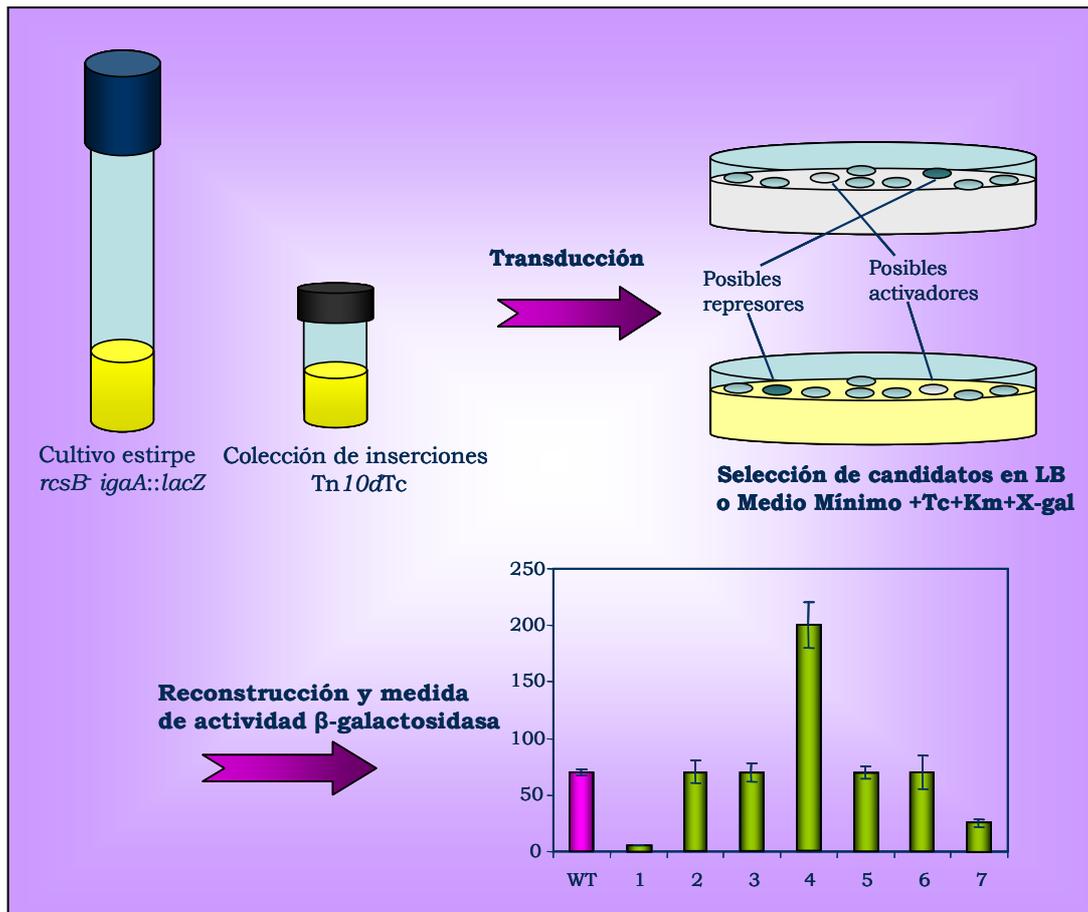


Figura C4.4. Esquema del escrutinio genético llevado a cabo para identificar reguladores del gen *igaA*. Se construyó una estirpe con una mutación nula en *rcsB* y una fusión transcripcional o traduccional en el gen *igaA*. Se realizó una mutagénesis con una colección de inserciones *Tn10dTc*. Se analizaron 45.000 colonias en cada escrutinio en cajas de LB o medio mínimo suplementado con Tc, Km y X-gal.

De 45.000 inserciones analizadas tanto en LB como en medio mínimo, sólo 2 presentaban diferencias de expresión significativas y repetitivas. Para saber dónde estaban las inserciones de *Tn10dTc*, y por tanto identificar las mutaciones que modificaban la expresión de *igaA*, se clonaron en pBluescript fragmentos de ADN cromosómico con el gen de resistencia a Tc del *Tn10d* tras digestión con *Bam*HI o *Pst*I. Los insertos se secuenciaron con los cebadores T3 y T7 o *Tn10d5'* y *Tn10d3'* (**Tabla M4**). Los resultados de las secuenciaciones se muestran en la **Tabla C4.1**.

Escrutinio	Gen	Proteína	Referencia
------------	-----	----------	------------

Fusión transcripcional en medio mínimo	<i>lon</i>	Proteasa	(Bukhari y Zipser 1973, Chung y Goldberg 1981, Zehnbauer <i>et al.</i> 1981)
Fusión traduccional en LB	<i>mviA</i>	Regulador de respuesta	(Swords y Benjamin 1994, Benjamin <i>et al.</i> 1996)

Tabla C4.1. Resultados obtenidos en el escrutinio.

Tras reconstruir los mutantes se midió la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcional y traduccional *igaA::lacZ* en fondo silvestre y en los dos fondos mutantes. Los resultados para la fusión transcripcional se representan en la **Figura C4.5**. Se obtuvieron resultados similares con la fusión traduccional.

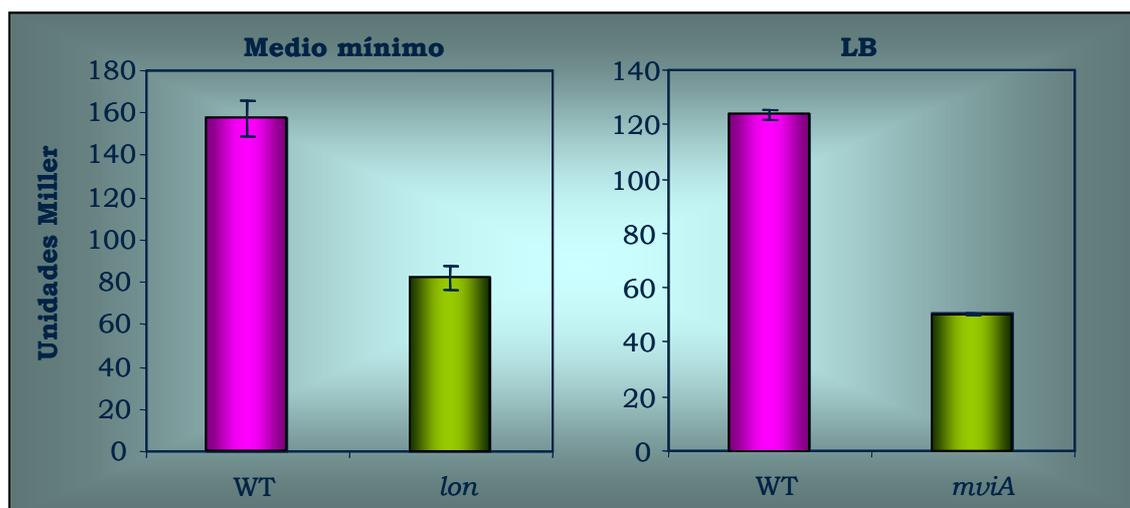


Figura C4.5. Expresión de *igaA* en los mutantes obtenidos en el escrutinio. Todos los fondos son *rcsB*. El efecto de la mutación *lon* sólo se observa en medio mínimo. Dado que el mutante *mviA* se obtuvo en LB, los ensayos presentados se realizaron en dicho medio. Las gráficas representan la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

Los datos indican que tanto Lon como MviA influyen en la transcripción de *igaA*, aunque MviA se detectara en el escrutinio con la fusión traduccional. La proteasa Lon podría degradar un represor transcripcional de *igaA*. Por su parte, MviA tiene el interés de ser un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes implicado en

el control de la virulencia de *Salmonella* (Benjamin *et al.* 1986, Benjamin *et al.* 1991, Swords *et al.* 1997). Por ese motivo decidimos llevar a cabo un estudio en mayor profundidad del efecto de MviA sobre la expresión de *igaA*.

4.3. Estudio del papel del gen *mviA* en la regulación de *igaA* y del sistema Rcs

El gen *mviA* fue descrito en los años 80 (Benjamin *et al.* 1986) y recibió el nombre de *mviA* por “mouse virulence gene A” (Benjamin *et al.* 1991). Una mutación nula en este gen provoca avirulencia en ratones para casi todas las estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ensayadas (Swords *et al.* 1997), excepto en los derivados de la estirpe LT2 que se utilizan en muchos laboratorios. En 1948 se describió que esta estirpe era virulenta para ratones (Lillengen 1948). Los derivados avirulentos de LT2 recuperan la virulencia por mutaciones *mviA* (Benjamin *et al.* 1991). La avirulencia presenta una correlación con otro fenotipo asociado a las mutaciones *mviA*: el fenotipo de colonia pequeña o Scm⁺ (de “small colony morphology”). En *E. coli* existe un homólogo de *mviA* denominado *rssB* (Muffler *et al.* 1996) o *sprE* (Pratt y Silhavy 1996). El extremo N-terminal de MviA/RssB/SprE es muy similar al de CheY y otros reguladores de respuesta pertenecientes a sistemas de dos componentes, e incluye un aspártico en posición 58 cuya fosforilación parece intervenir en la activación de MviA (Cunning y Elliott 1999). No está claro del todo cómo se controla dicha fosforilación, aunque se ha sugerido la intervención del acetil fosfato (Bouche *et al.* 1998) y de la quinasa ArcB (Mika y Hengge 2005). La región carboxilo de MviA, sin embargo, no tiene similitud con otras proteínas conocidas ni parece presentar un dominio de unión a ADN, por lo que no parece probable que actúe como regulador transcripcional. Se ha demostrado, en cambio, que MviA participa en la regulación postraduccional del factor sigma RpoS. Los mutantes *mviA* (*rssB* o *sprE* en *E. coli*) presentan niveles elevados de RpoS, que parecen ser responsables, al menos en parte, de los fenotipos

de dichos mutantes (Bearson *et al.* 1996, Muffler *et al.* 1996, Pratt y Silhavy 1996). En este contexto, la función de MviA consiste en unirse a RpoS y servir como adaptador para posibilitar su reconocimiento y degradación por la proteasa ClpXP (Klauck *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2001).

a) *mviA* regula a *igaA* a través de RpoS

Dado que una mutación nula *mviA* provoca un aumento en los niveles de RpoS, parecía lógico pensar en la posibilidad de que dicho aumento fuera responsable de la disminución de la transcripción de *igaA*. Para ensayar esta hipótesis comparamos la expresión de la fusión transcripcional *igaA::lacZ*, siempre en fondos con una mutación *rscB* nula, acompañada o no por mutaciones *mviA* y *rpoS*. Como se observa en la **Figura C4.6**, la mutación *rpoS* aumenta significativamente la actividad de la fusión, y sobre todo suprime el efecto de la mutación *mviA*. Estos resultados son coherentes con la hipótesis de que la regulación de *igaA* por *mviA* está mediada por RpoS.

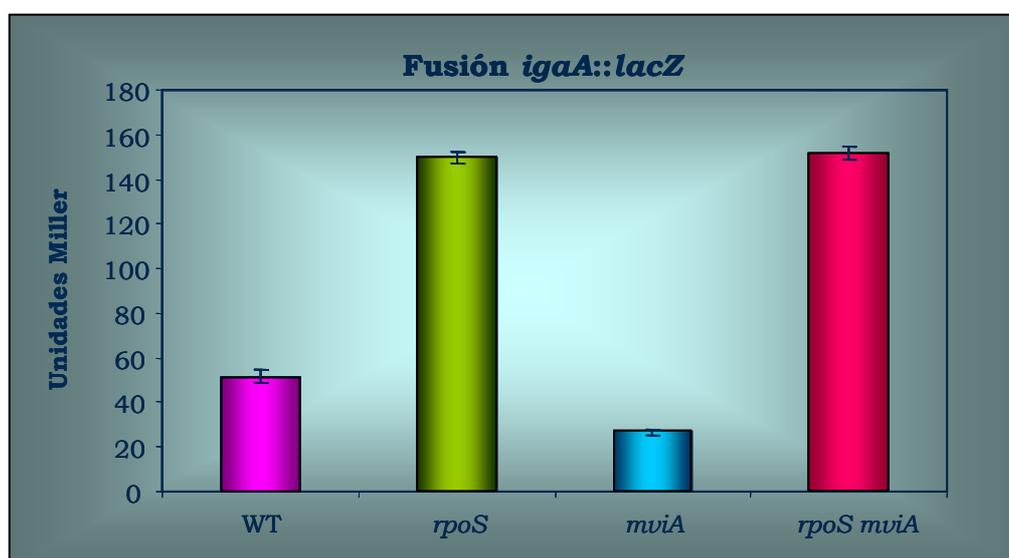


Figura C4.6. El efecto de *mviA* sobre *igaA* está mediado por RpoS. Actividades β -galactosidasa medidas en estirpes *rscB* portadoras de la fusión transcripcional *igaA::lacZ* y de mutaciones *rpoS* y *mviA*. Se representa la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

b) Otros genes relacionados con el control postraducciona de RpoS también regulan a *igaA*

En *E. coli*, la proteína asociada al nucleoide H-NS regula negativamente la traducción del ARNm de *rpoS* y la estabilidad de la proteína. Un mutante *hns* presenta un incremento de 10 veces tanto en la tasa de síntesis como en la estabilidad de RpoS (Barth *et al.* 1995, Yamashino *et al.* 1995). Este último efecto está mediado por RssB (MviA) y se ha postulado la existencia de un antiadaptador, todavía no identificado, que impediría la acción de RssB sobre RpoS y que estaría regulado negativamente por H-NS (Zhou y Gottesman 2006, Bougdour *et al.* 2008). Si hubiera una relación similar entre MviA y H-NS en *Salmonella*, cabría esperar que una mutación *hns* afectara a la expresión de *igaA*.

En *Salmonella*, pero no en *E. coli*, el regulador de respuesta PhoP controla la estabilidad de RpoS a través de la activación transcripcional del gen *iraP*, cuyo producto es un antiadaptador que interacciona con MviA e impide su acción (Tu *et al.* 2006). De acuerdo con nuestros resultados anteriores, sería previsible que PhoP influyera también en la expresión de *igaA*.

Teniendo en cuenta esos antecedentes, ensayamos el efecto de mutaciones *hns* y *phoP/phoQ* sobre la expresión de la fusión transcripcional *igaA::lacZ*. La mutación *hns* es letal en fondo 14028 (la estirpe silvestre de *Salmonella* usada en esta tesis). Por ese motivo los experimentos con *hns* se realizaron en fondo LT2, donde dicho problema se evita gracias a una mutación puntual rezumante en *rpoS* (Swords *et al.* 1997, Wilmes-Riesenberg *et al.* 1997). Del sistema de dos componentes PhoPQ se ensayaron dos mutaciones: una mutación nula en *phoP*, y la mutación *pho-24*, que activa constitutivamente el sistema. Los resultados presentados en la **Figura C4.7** indican que tanto la mutación *hns* como la mutación *pho-24* causan una disminución significativa de la expresión de *igaA* ($P < 0,001$ según la t de Student), lo que está de acuerdo con nuestras predicciones.

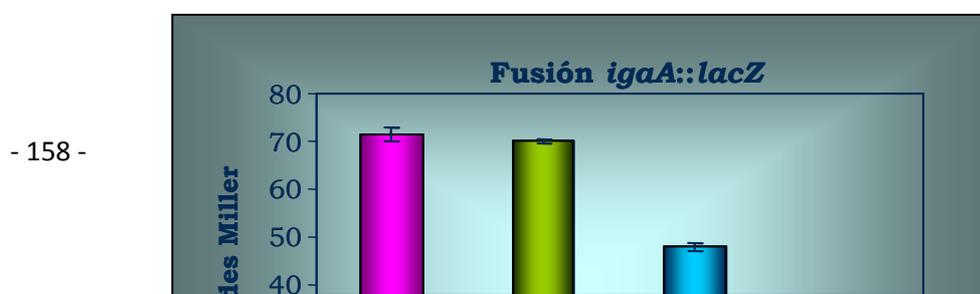


Figura C4.7. H-NS y PhoP regulan la transcripción de *igaA*. Actividades β -galactosidasa medidas en estirpes *rscB* portadoras de la fusión transcripcional *igaA::lacZ* y de mutaciones *hns* y *pho*, según se indica. Se representa la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

c) Algunos fenotipos del mutante *mviA* están mediados por RcsB

La regulación de *igaA* por *mviA*, sumada a la función de *igaA* como inhibidor de la actividad del sistema de regulación Rcs, nos hicieron plantear la posibilidad de que algunos de los efectos de la mutación *mviA* pudieran estar mediados por el sistema Rcs. Este sistema regula la expresión de los genes del flagelo reprimiendo el operón *flhDC*. Para ensayar el efecto de la mutación *mviA* sobre el flagelo utilizamos una fusión transcripcional *flgK::lacZ*. Como puede observarse en la **Figura C4.8**, el nivel de expresión de esta fusión desciende prácticamente a cero en un fondo *mviA*, lo que es coherente con la idea de que esta mutación causa activación del sistema Rcs. La supresión del efecto de *mviA* sobre la fusión *flgK::lacZ* por una mutación *rscB* confirma esta idea.

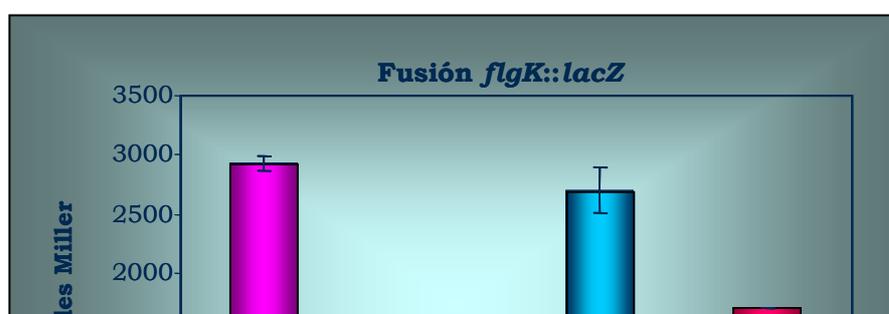
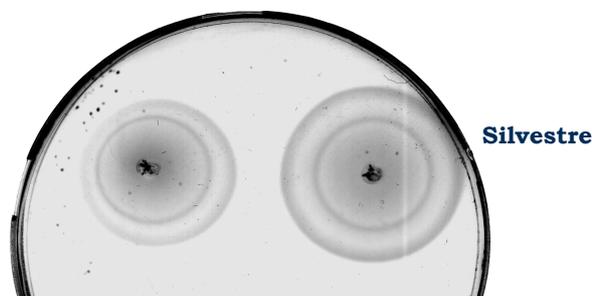


Figura C4.8. MviA controla la expresión de los genes del flagelo por medio de RcsB. Actividades β -galactosidasa medidas en estirpes portadoras de la fusión transcripcional *flgK::lacZ* y de mutaciones *mviA* y *rscB*, según se indica. Se representa la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

El efecto observado de MviA y RcsB sobre la expresión de *flgK* se pudo corroborar en ensayos de movilidad. Se prepararon inóculos en medio de movilidad. En fase exponencial, se mojó un palillo estéril en cada cultivo y se inoculó en el centro de una caja de medio semisólido. Como se puede observar en la **Figura C4.9**, el mutante *mviA* es inmóvil y una mutación *rscB* suprime parcialmente dicho fenotipo. Ello concuerda con los datos de actividad β -galactosidasa obtenidos con la fusión *flgK::lacZ*.

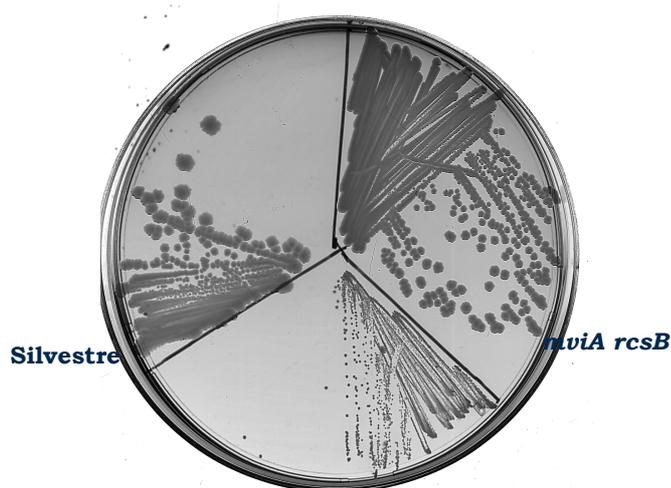


mviA rcsB

mviA

Figura C4.9. El mutante *mviA* es inmóvil. Mediante experimentos en medio de movilidad se obtiene un resultado coherente con el observado para la expresión de *flgK*. Una mutación nula en *rcsB* suprime parcialmente el efecto de *mviA*. La foto está tomada tras 6 horas a 37°C.

El hecho de que el fenotipo de inmovilidad de *mviA*, que describimos aquí por primera vez, estuviera mediado por RcsB, nos hizo pensar que otros fenotipos ya conocidos de dicho mutante también pudieran estar mediados por este regulador. Uno de los fenotipos más evidentes de los mutantes *mviA* es la formación, ya mencionada, de colonias pequeñas (Scm^+). La observación visual de colonias de la estirpe silvestre y de mutantes *mviA* y *mviA rcsB* (**Figura C4.10**) sugiere que, en efecto, la activación del sistema Rcs está implicada en dicho fenotipo.



mviA

Figura C4.10. Una mutación nula en *rcsB* suprime el fenotipo de colonia pequeña del mutante *mviA*. Se muestra el crecimiento en medio LB sólido de las estirpes indicadas. Una mutación nula en *rcsB* suprime el fenotipo de colonia pequeña.

Uno de los fenotipos más interesantes del mutante *mviA* de *Salmonella* es su atenuación en ensayos de infección de ratones (Swords y Benjamin 1994). Se ha sugerido que dicha atenuación se debe al aumento del nivel de RpoS (Swords *et al.* 1997, Wilmes-Riesenberg *et al.* 1997). Sin embargo, es una hipótesis que no se ha podido confirmar directamente debido a que mutaciones de pérdida de función en *rpoS* también producen atenuación (Fang *et al.* 1992). En el capítulo 1 de esta Tesis hemos mostrado que una activación excesiva del sistema Rcs causa atenuación (Domínguez-Bernal *et al.* 2004, García-Calderón *et al.* 2005). Los experimentos mostrados hasta ahora en este capítulo indican que la mutación *mviA*, al reducir los niveles de IgaA, da lugar a la activación de RcsB. Todo esto sugiere que la avirulencia del mutante *mviA* puede estar mediada, al menos en parte, por el sistema Rcs. Si nuestra hipótesis fuese cierta, una mutación nula en *rcsB* volvería virulenta a la estirpe *mviA*. Para ensayar esta posibilidad calculamos el índice de competitividad en ratones del mutante *mviA* y del doble mutante *mviA rcsB*, ambos tras infecciones mixtas con la estirpe silvestre por vía intraperitoneal. Los resultados de estos ensayos, que se muestran en la **Figura C4.11**, indican una supresión muy significativa, aunque parcial, de la avirulencia de *mviA* por *rcsB*, y apoyan la hipótesis formulada.



Figura C4.11. Una mutación en *rscB* suprime, parcialmente, la atenuación del mutante *mviA*. Se calculó el índice de competitividad del mutante *mviA* y del doble mutante *mviA rcsB* frente a la estirpe silvestre. La supresión no es total. La gráfica representa la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

d) MviA regula a RcsB por una vía independiente de RpoS e IgaA

La interpretación más simple de los datos mostrados hasta aquí es que la mutación *mviA* activa a RcsB a través del descenso en los niveles de IgaA, por su parte debido a la elevación de los niveles de RpoS. Según este modelo, cabría esperar que los fenotipos del mutante *mviA* suprimidos por mutaciones nulas *rscB* fueran también suprimidos por mutaciones nulas *rpoS*. Esta idea es apoyada por el hecho de que el fenotipo de colonia pequeña, que es suprimido por una mutación *rscB*, también sea suprimido por una mutación *rpoS* (Swords *et al.* 1997). Esta mutación, por otro lado, no puede suprimir el fenotipo de atenuación debido a la avirulencia del propio mutante *rpoS*, como ya se ha indicado. Pareció lógico examinar el posible efecto sobre los genes de flagelo. Sorprendentemente, como se observa en la **Figura C4.12**, la mutación *rpoS* no suprime el efecto de la mutación *mviA* sobre la expresión de *flgK*. Además el doble mutante *mviA rpoS* es inmóvil (**Figura C4.13**). Este resultado sugiere que *mviA* puede afectar a la actividad de RcsB por una vía independiente de RpoS e IgaA.



Figura C4.12. MviA controla la expresión de los genes del flagelo por una vía independiente de RpoS, IgaA y RcsC. Se muestran las actividades β -galactosidasa medidas en estirpes portadoras de la fusión transcripcional *flgK::lacZ* y de mutaciones *mviA*, *rpoS*, *rscC* y del plásmido pBAD-*igaA*, según se indica. Se representa la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

Para examinar esta posibilidad utilizamos una mutación nula en el gen *rscC*, que codifica la histidina kinasa situada en un punto intermedio de la vía de señalización entre IgaA y RcsB. Dicha mutación fue incapaz de suprimir los efectos de la mutación *mviA* sobre la expresión de *flgK* (**Figura C4.12**), la movilidad (**Figura C4.13**) y el tamaño de colonia. Por otro lado, la introducción de un derivado de pBAD18 que expresa *igaA* desde un promotor dependiente de arabinosa (pNG1166, descrito en el capítulo 2 de esta Tesis) tampoco alteró los fenotipos mencionados para el mutante *mviA* (**Figuras C4.12 y C4.13**).





Figura C4.13. La inmovilidad del mutante *mviA* no es suprimida por mutaciones en *rscC*, por sobreexpresión de *IgaA* o por mutaciones en *rpoS*. Mediante experimentos en medio de movilidad se obtiene un resultado coherente con el observado para la expresión de *flgK*. La foto está tomada tras 6 horas a 37°C.

A la vista de estos resultados, decidimos examinar el posible papel de MviA en el control de la expresión de *rscB*. Para ensayar posibles efectos a nivel transcripcional empleamos una fusión transcripcional *rscB::lacZ*. Como se muestra en la **Figura C4.14**, la expresión de esta fusión se ve poco afectada por una mutación *mviA*.

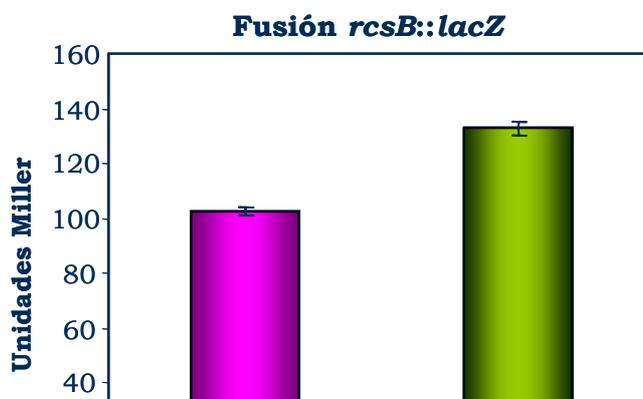


Figura C4.14. La proteína MviA no afecta a la expresión de *rcsB*. Mediante experimentos de medida de la actividad β -galactosidasa se observa que no hay cambios en la expresión de una fusión transcripcional *rcsB::lacZ*.

Para examinar los efectos postranscripcionales, utilizamos una estirpe que expresa RcsB fusionada al epitopo 3xFLAG, y cuantificamos los niveles de la proteína de fusión en distintos fondos genéticos mediante hibridaciones western. El resultado de este experimento se muestra en la **Figura C4.15**. Se observa un incremento muy significativo en los niveles de RcsB en fondo *mviA*. Esto sugiere que MviA, además de tener una función en la regulación transcripcional de *igaA*, interviene en el control de los niveles de la proteína RcsB.

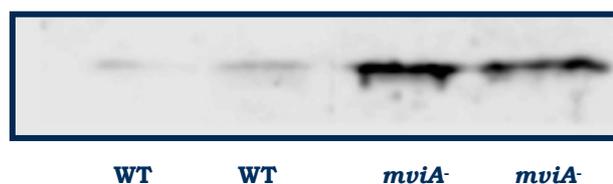


Figura C4.15. La proteína RcsB es más estable en fondo mutante *mviA*. Mediante experimentos de *western-blot* se observa que el nivel de acumulación de la proteína RcsB es mayor en el fondo mutante *mviA* que en el silvestre.

DISCUSIÓN

El sistema Rcs se describió inicialmente como un sistema de dos componentes que controla la producción de la cápsula de ácido colánico en *E. coli* (Gottesman *et al.* 1985, Brill *et al.* 1988). Actualmente se sabe que este sistema es más complejo, con tres componentes en la cascada de señalización (Takeda *et al.* 2001) y otras proteínas auxiliares, y que está implicado en la regulación de muchos procesos celulares, como la regulación de la división celular (Carballès *et al.* 1999), la síntesis de flagelo (Francez-Charlot *et al.* 2003), la expresión del antígeno Vi de *S. enterica* serovar Typhi (Virlogeux *et al.* 1996) y muchos más.

En las condiciones de cultivo habituales en el laboratorio, el nivel de activación del sistema Rcs parece ser muy bajo. Por ello, mutaciones nulas en sus componentes tienen pocos efectos fenotípicos. Se han descrito al menos dos estímulos capaces de activar el sistema: uno es el choque osmótico (Sledjeski y Gottesman 1996) y el otro es una combinación de baja temperatura y glucosa o zinc (Hagiwara *et al.* 2003). Sin embargo, la activación producida por estos estímulos es transitoria. Por ese motivo, las funciones del sistema Rcs se han inferido fundamentalmente de análisis genéticos, gracias a la capacidad de mutaciones nulas en los genes del sistema para suprimir el efecto de mutaciones en otros genes. En *E. coli*, mutaciones nulas en *mdoH* causan un incremento en la producción de ácido colánico, que es suprimido por mutaciones nulas en los genes *rcaA*, *rcaB* o *rcaC* (Ebel *et al.* 1997). Del mismo modo, en *Salmonella*, alelos viables de *igaA* dan lugar a inducción de los genes *wca*, represión de *flhDC* y avirulencia, y todos estos fenotipos se suprimen por mutaciones nulas en *rcaB* o *rcaC* (Costa y Antón 2001, Cano *et al.* 2002, Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Esto indica que IgaA funciona como un regulador negativo del sistema Rcs.

Una forma de analizar la función de un sistema de dos componentes es conseguir alelos mutantes que causen activación constitutiva del mismo. Por ese motivo, en esta Tesis nos planteamos aislar una colección de esa clase de mutantes para el sistema Rcs de

Salmonella, y proceder a su caracterización a nivel de secuencia de ADN. Entre los 24 mutantes *rscC* constitutivos independientes aislados se encontraron 11 sustituciones aminoacídicas diferentes, todas localizadas en la región citoplásmica principal de la proteína. Las mutaciones que causan una mayor activación del sistema se localizan en el dominio histidina quinasa propio de las proteínas sensoras de los sistemas de dos componentes (mutaciones F473I, F473Y, P484L, P484S e I531S) o en el dominio receptor similar al de los reguladores de respuesta (N877S y T903A). Además, las mutaciones en el dominio de entrada de la señal o en el dominio de la histidina quinasa (también llamado dominio transmisor) son dominantes, mientras que las situadas en el dominio receptor son recesivas. Las mutaciones recesivas suelen implicar pérdida de función. Por tanto, mientras que la mayoría de las mutaciones que encontramos producen un incremento en una actividad positiva de RcsC (mutaciones dominantes, probablemente de ganancia de función), las mutaciones N877S y T903A parecen eliminar una función negativa para la activación del sistema. Esto es coherente con resultados previos obtenidos en *E. coli*, en los que se había visto que el alelo *rscC137*, que causa sobreexpresión de la cápsula de ácido colánico, es recesivo (Gottesman *et al.* 1985), que RcsC tiene efectos reguladores positivos y negativos en la expresión de los genes *wca* (Brill *et al.* 1988, Stout y Gottesman 1990), y que la actividad negativa de RcsC está localizada en el dominio receptor (Clarke *et al.* 2002). Se ha propuesto que esta actividad negativa es en realidad una actividad fosfatasa (Gottesman 1995, Clarke *et al.* 2002), como ocurre en otros sistemas de dos componentes (West y Stock 2001).

Una búsqueda en la base de datos CDC (Conserved Domain Database) (Marchler-Bauer *et al.* 2003) indica que RcsC contiene dos dominios conservados: el dominio histidina quinasa y el dominio receptor de la señal (regulador de respuesta). Las cinco mutaciones encontradas en el dominio histidina quinasa se localizan en un subdominio llamado dominio histidina quinasa A o dominio de dimerización/fosfoceptor.

Este dominio contiene la histidina fosforilable. Además, en algunos casos, se ha demostrado que la dimerización a través de este dominio es necesaria para la activación (West y Stock 2001). Los tres residuos de este dominio que han cambiado en nuestros mutantes (Phe473, Pro484 e Ile531) forman parte de la secuencia consenso del dominio. Pro484 está especialmente conservado, y resulta interesante el hecho de que los residuos correspondientes a Phe473 y Pro484 de RcsC en la proteína EnvZ de *E. coli* (Tomomori *et al.* 1999), tengan un papel en la dimerización como parte del punto de contacto. Tienen especial interés dos mutaciones distintas que aparecieron en el mismo aminoácido, P484L y P484S. Se aislaron independientemente 5 y 3 veces respectivamente, y muestran los niveles más altos de activación de la fusión *gmm::lacZ*, con un aumento de >500 veces sobre la expresión en fondo silvestre. Estos mutantes crecen más lentamente que la estirpe silvestre y que el resto de mutantes *rscC* constitutivos, y presentan una frecuencia de reversión relativamente elevada. Estas características pueden estar relacionadas con hallazgos previos sobre la letalidad de las mutaciones nulas *igaA* (Cano *et al.* 2002, Costa *et al.* 2003). La letalidad es suprimida por mutaciones en *rscC*, *rscD* o *rscB*, lo que sugiere que la sobreactivación del sistema Rcs puede conducir a la represión de un gen esencial, o a la activación de un gen cuya sobreexpresión es letal. Puede ser que los mutantes afectados en la Pro484 estén próximos al nivel máximo de activación del sistema Rcs compatible con la viabilidad.

Se encontraron dos mutaciones diferentes en el dominio receptor de RcsC: N877S y T903A. Este dominio es un 38% idéntico al de la proteína CheY de *E. coli*. La estructura cristalográfica de CheY revela la existencia de cinco residuos altamente conservados en el sitio activo del regulador de respuesta: Asp57 (el sitio de fosforilación) (Sanders *et al.* 1989); Asp12 y Asp13 (implicados en la coordinación del ion Mg⁺⁺ esencial para las reacciones de fosforilación y desfosforilación) (Stock *et al.* 1993); Lys109 (importante en el cambio conformacional inducido por fosforilación) (Lukat *et al.* 1991); y Thr87 (también implicado en el cambio

conformacional por medio de la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo OH y el sitio activo) (Appleby y Bourret 1998, Cho *et al.* 2000). Los sitios equivalentes en RcsC son Asp875, Asp831, Asp832, Lys925 y Thr903. Mutaciones equivalentes a T903A se han descrito para OmpR (T83A) y CheY (T87A). En ambos casos la sustitución conlleva activación constitutiva, quizá debido a que el cambio conformacional imita la conformación del dominio activado, y se había propuesto que esta sustitución podía tener un efecto idéntico de activación en todos los reguladores de respuesta (Smith *et al.* 2004). Esta hipótesis recibe ahora el apoyo de nuestra observación de que la mutación correspondiente T903A tiene también un efecto activador en RcsC. Por otro lado, los residuos Thr87 de CheY y Thr83 de OmpR parecen estar implicados en reacciones de desfosforilación (Sanders *et al.* 1989, Brissette *et al.* 1991). Esto estaría de acuerdo con la idea de que T903A, una mutación recesiva, esté impidiendo la presunta actividad fosfatasa de RcsC. La segunda mutación encontrada en el dominio receptor se localiza en la Asn877, un residuo no conservado en las cercanías del sitio activo. Según la estructura predicha por el programa SWISS-MODEL (Gueux y Peitsch 1997), el cambio de Asn877 por Ser incrementa su contacto con el sitio de fosforilación. Diferentes sustituciones en la posición correspondiente en VirG (N54D) (Han *et al.* 1992, Pazour *et al.* 1992, Jin *et al.* 1993, Scheeren-Groot *et al.* 1994), CheB (E58K) (Stewart 1993) y CheY (N59K, N59R) (Silversmith *et al.* 2001) tienen también un efecto activador, lo que es indicativo de la importancia de este residuo no conservado en la activación de los dominios reguladores de respuesta.

El estudio realizado con estos mutantes *rscC* ha aportado varios indicios que apoyan la hipótesis de que la sobreactivación del sistema Rcs de *Salmonella* produce atenuación de la virulencia. En primer lugar, los mutantes *rscC* constitutivos están atenuados en ratón. En segundo lugar, existe una correlación perfecta entre el grado de atenuación y el nivel de activación del sistema causado por las diferentes mutaciones. Además, también ha quedado establecido que la sobreproducción de

cápsula es un factor relevante en la atenuación de estos mutantes, ya que una inserción en *gmm* o *rscA* produce una recuperación parcial, pero significativa, de la virulencia en ratones. Dado que la supresión no es completa, se concluye también que deben existir otros genes regulados por Rcs, implicados en virulencia, responsables de la atenuación del mutante *rscC* constitutivo.

Partiendo de la idea de que deben existir otros genes regulados por Rcs relacionados con la virulencia, y con la intención de caracterizar más en profundidad el regulón Rcs, realizamos un escrutinio para tratar de identificar nuevos genes regulados por el sistema Rcs. Para ello llevamos a cabo escrutinios genéticos clásicos basados en el transposón MudJ. Con este método se obtienen fusiones transcripcionales (Casadaban y Chou 1984), cuya expresión se comparó en condiciones de alta y baja activación del sistema Rcs. Estas condiciones se consiguieron empleando un mutante *igaA* (Cano *et al.* 2002, Domínguez-Bernal *et al.* 2004) portador de un derivado del plásmido pBAD18 (Guzman *et al.* 1995), que expresa el alelo silvestre de *igaA* bajo un promotor regulado por arabinosa, o bien mediante la expresión de la proteína RcsB desde un derivado del mismo plásmido (Brill *et al.* 1988). Los resultados obtenidos en este escrutinio solapan sólo parcialmente con los obtenidos en *E. coli* (Oshima *et al.* 2002, Ferrières y Clarke 2003, Hagiwara *et al.* 2003). Esto se puede deber a diferencias entre las especies *E. coli* y *S. enterica*, pero también a las diversas metodologías empleadas (micromatrices, fusiones transcripcionales), y a las distintas condiciones usadas para la activación del sistema Rcs (crecimiento a 20°C con glucosa y ZnCl₂, superproducción de DjlA, mutaciones *igaA*, superexpresión de *rscB*).

Todos los genes encontrados en el escrutinio están realmente regulados por RcsB, como se sospechaba por el hecho de que los fenotipos asociados al mutante *igaA1* eran suprimidos por mutaciones en los genes *rscB*, *rscC* o *rscD* (Cano *et al.* 2002). Además, de estos escrutinios se pueden extraer algunos detalles interesantes:

1. La regulación de STM2176 parece ser independiente de RcsC, lo que contrasta con el resto de los genes.
2. Mutaciones nulas en los genes *rscB* o *rscC* suprimen sólo parcialmente la represión ejercida por la activación del sistema Rcs sobre el gen *narH*.
3. Mutaciones nulas en *rscB* o *rscC* no sólo suprimen la represión de *siuE* por *igaA5* sino que incrementan su expresión por encima de los niveles silvestres.
4. Algo parecido ocurre con *sfrA* pero en este caso sólo para la mutación *rscB*, no para *rscC*.

Estos resultados sugieren que en nuestras condiciones experimentales, la proteína RcsB no está completamente inactiva en la estirpe silvestre. Además, estos datos indican que el acetil fosfato u otro donador de fosfato desconocido podrían tener un papel independiente de RcsC en la fosforilación de RcsB (Majdalani *et al.* 2005, Ferrières *et al.* 2007).

Los genes encontrados en nuestros escrutinios se pueden clasificar en varios grupos. En el primero se incluyen genes que ya se sabía que eran miembros de los regulones Rcs de *Salmonella* y de *E. coli*, como los genes necesarios para la síntesis de la cápsula de ácido colánico, para la síntesis de flagelos y para la quimiotaxia (Cano *et al.* 2002). La identificación de estos genes sirve para validar el método usado.

Otro grupo está formado por genes que tienen homólogos en *E. coli*, pero que no se habían identificado previamente como miembros del regulón Rcs de *Salmonella*, aunque dos de ellos, *yiaD* e *yjbH*, se habían descrito como parte de este regulón en *E. coli*. Estos dos genes se describieron como regulados por RcsC en un escrutinio de fusiones transcripcionales generadas por λ placMu53 (Ferrières y Clarke 2003). En el mismo estudio, mediante experimentos de “macroarray”, se encontró regulación por RcsC de los genes *yjbE*, *yjbF* y *yjbG*, los tres genes corriente arriba de *yjbH* (Ferrières y Clarke 2003). Las similitudes de secuencia con genes conocidos indican que *yiaD* e *yjbH* podrían codificar lipoproteínas. Resulta interesante que muchos genes regulados por el

sistema Rcs en *E. coli* (Hagiwara *et al.* 2003) codifiquen proteínas asociadas a la envuelta celular, incluyendo tres hipotéticas lipoproteínas. Todos estos genes están regulados positivamente por el sistema Rcs, incluidos *yiaD* e *yjbH*. Esto apoya la relación del sistema Rcs no sólo con la producción de cápsula, sino también con otros procesos relacionados con la superficie, como la formación de biofilm (Ferrières y Clarke 2003) y el movimiento de “swarming” (Takeda *et al.* 2001). Los demás genes de este segundo grupo están regulados negativamente por el sistema Rcs. Entre ellos se incluyen *narH* y *dcuB*, lo que sugiere que el sistema Rcs podría tener un papel en el control de la respiración anaeróbica. De hecho, FlhD y FlhC, ambos regulados negativamente por RcsB, se sabe que regulan genes relacionados con la respiración anaeróbica en *E. coli* (Pruss *et al.* 2003), aunque *dcuB* y *narH* no están en esta lista. Además, según nuestros resultados, ni FlhD ni FlhC regulan estos genes en *Salmonella enterica*. Otros genes dentro de este grupo son *yhhJ* y *melB*. Estos dos genes están relacionados con el metabolismo, ya que codifican un componente de un sistema de transporte de la superfamilia ABC y un transportador de azúcares, respectivamente. Esto implica al sistema Rcs en el control del metabolismo.

El último grupo de genes identificados en estos escrutinios está formado por loci específicos de *Salmonella*, ausentes en otras bacterias relacionadas. Entre estos genes hemos descrito dos que codifican proteínas secretadas: *bapA* y *siiE*. El producto de *bapA* es una proteína de la superficie celular requerida para la formación de biofilm en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Latasa *et al.* 2005). Un dato que resulta interesante es el hecho de que el sistema Rcs esté implicado en la formación de biofilm en *Escherichia coli* (Ferrières y Clarke 2003). Por su parte, *siiE* está localizado en la isla de patogenicidad 4, una región cromosómica específica de *Salmonella* (Wong *et al.* 1998) constituida por un operón con seis genes, que codifican una proteína secretada, SiiE, y los componentes del correspondiente sistema de secreción de tipo I (McClelland *et al.* 2001). Existen estudios que describen el requerimiento

de esta isla para la infección intestinal en ratones, aunque no interviene en la infección sistémica (Morgan *et al.* 2004).

Otros genes específicos de *Salmonella* aparecidos en el escrutinio son STM1491, STM2176 y PSLT071. No se sabe la función de las proteínas codificadas por estos genes, y sólo se pueden hacer suposiciones basadas en similitud de secuencia. Así, el gen STM1491 tiene homología con transportadores de la superfamilia ABC, más concretamente con el componente de unión al ATP. Por otro lado, el gen STM2176 podría codificar una enzima que transfiere radicales de azufre desde el glutatión, interviniendo en modificaciones postraduccionales de las proteínas. Y por último, el gen PSLT071, situado en el plásmido de virulencia pSLT, sólo guarda similitud con genes de otros plásmidos de la misma familia, y se desconoce su función.

El resto de los genes aparecidos en el escrutinio son *srfA* y *srfB*. Estos genes también son específicos de *Salmonella*. Junto con el gen *srfC* parecen formar un operón de 7 kb, que es parte de una región de ADN que parece haber sido adquirida horizontalmente, y que se describió como regulada por SsrB (Worley *et al.* 2000), un regulador codificado en la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2) que es necesario para la expresión del sistema de secreción tipo III de la SPI-2 (Hensel *et al.* 1995, Deiwick *et al.* 1999). Experimentos de actividad transcripcional mediante ensayos de β -galactosidasa y experimentos de “western-blot” han mostrado que en realidad estos genes se expresan en condiciones de activación de la isla 1, y no en las condiciones de la isla 2. De hecho, nuestros resultados muestran que este operón, además de estar reprimido por el sistema Rcs, está regulado negativamente por el sistema de dos componentes PhoPQ, y, como sospechábamos al no expresarse en condiciones de activación de la isla 2, no están regulados por el sistema SsrAB. La función de las proteínas Srf se desconoce. Sin embargo, la proteína SrfC presenta homología con una proteína del patógeno de plantas *Pseudomonas syringae*, cuyo producto se secreta a través de un

sistema de secreción tipo III. Dado su patrón de expresión, investigamos si estas proteínas también eran efectores y si se secretaban por el sistema de secreción tipo III de la SPI-1. Los experimentos de secreción mostraron que sólo la proteína SrfC era secretada por el sistema de secreción tipo III. Aun así, los niveles de secreción eran mucho menores que los de SlrP, una proteína efectora usada como control.

Anteriormente se había encontrado que algunos de los genes regulados positivamente por el sistema PhoPQ también estaban regulados por RcsB, lo que sugería la existencia de un circuito de regulación cruzada entre estos dos sistemas (Tiérrez y García-del Portillo 2004). Sin embargo, estudios *in vivo* demostraron que la atenuación de la virulencia causada por la activación del sistema Rcs no está relacionada con la pérdida de función del sistema PhoPQ (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). En estos experimentos, por tanto, no se encontró ningún solapamiento entre estos dos sistemas en el control de la virulencia. Sin embargo, nuestros experimentos muestran que el operón *srfABC* está reprimido por ambos sistemas, Rcs y PhoPQ, y por tanto es un ejemplo de genes reprimidos por PhoP que están reprimidos simultáneamente por RcsB. Sobre esta base, estudiamos el efecto de una mutación que causa una activación constitutiva del sistema Rcs (*igaA*) y una mutación que provoca una activación constitutiva del sistema PhoPQ (*pho-24*) en el modelo del ratón. Si existen genes de virulencia reprimidos por ambos sistemas se debería detectar un efecto epistático en las infecciones con dobles mutantes. La ventaja principal de usar *igaA1* en los ensayos de virulencia en lugar de otro mutante *igaA* más atenuado es que se podría detectar el efecto aditivo de *pho-24* si existiese. Los resultados obtenidos son intermedios entre la aditividad y la epistasia, y esto sugiere por tanto un solapamiento parcial entre los sistemas Rcs y PhoPQ en el control de la virulencia de *Salmonella*. Esta interpretación es apoyada por la existencia de genes de virulencia que están reprimidos de forma simultánea por ambos sistemas, como *prgH* y otros genes de la SPI-1

(Mouslim *et al.* 2004), mientras que otros genes están bajo el control de sólo uno de los sistemas, como ocurre con los genes *ssaV* o *gmm*.

Dado el papel relevante de la proteína IgaA en la regulación del sistema Rcs, en la última parte de la Tesis se abordó el estudio del propio gen *igaA* y de su regulación. En este último capítulo hemos podido demostrar que:

1. *igaA* es el primer gen de un operón que incluye cuatro genes.
2. Su promotor es dependiente de σ^{70} .
3. Su transcripción está regulada por Lon y MviA. Además, esto nos ha llevado a estudiar las relaciones entre el sistema Rcs, MviA y RpoS. De hecho, nuestros resultados contribuyen a entender algunos de los fenotipos asociados a la mutación *mviA* que no pueden explicarse completamente a través de la regulación de los niveles de RpoS.

Aunque *igaA* sea el primer gen de un operón, resultados previos indican que ninguno de los fenotipos descritos para los mutantes *igaA* se debe a efecto polar sobre los otros genes del operón: por un lado, la mayoría de los mutantes estudiados son mutantes puntuales no polares (Cano *et al.* 2001, Cano *et al.* 2002, Domínguez-Bernal *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007); por otra parte, una inserción polar en el segundo gen del operón, *yrfG*, no es letal (Cano *et al.* 2002); por último, el alelo *igaA*⁺ expresado desde un plásmido es capaz de complementar a un mutante nulo (Cano *et al.* 2002). No existen datos experimentales sobre las funciones de *yrfG*, *yrfH* ni *yrfI*, aunque las similitudes de secuencia con otros genes indican que sus productos podrían ser una hidrolasa y dos proteínas de choque térmico (Hsp15 y Hsp30), respectivamente.

Puesto que el gen *igaA* es esencial, los mutantes viables deben llevar alelos rezumantes. En tres mutantes de este tipo estudiados previamente se observó un descenso en el nivel de la proteína IgaA, correlacionado con un incremento en la actividad del sistema Rcs (Domínguez-Bernal *et al.* 2004). Por tanto, tenía sentido pensar que los

niveles de *igaA* pudieran estar regulados como mecanismo para controlar la actividad del sistema Rcs. De hecho, en esta Tesis se indica que la expresión de *igaA* está regulada a nivel transcripcional por las proteínas Lon y MviA.

Aunque los primeros estudios sobre Lon la definieron como una proteína de unión a ADN, su capacidad para unirse a secuencias específicas no está clara. En cambio, está bien establecido que Lon es una proteasa homooligomérica dependiente de ATP, muy conservada en arqueas, bacterias, mitocondrias y peroxisomas eucarióticos [revisado en (Lee y Suzuki 2008)]. Por tanto, el efecto de Lon sobre la transcripción de *igaA* probablemente es indirecto. Lon lleva a cabo un control de calidad sobre proteínas mal plegadas, pero también es importante para la degradación de proteínas reguladoras de vida media corta. Una posibilidad sería que uno de los sustratos de Lon fuera un represor de *igaA*. Es interesante el hecho de que Lon degrade a RcsA (Torres-Cabassa y Gottesman 1987), un coactivador necesario para la transcripción de algunos genes del regulón Rcs. Nuestros resultados sugieren que Lon puede regular el sistema Rcs de dos maneras: directamente bajando los niveles de RcsA, e indirectamente elevando los niveles de IgaA.

Por su parte, MviA es un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes que no parece contener un dominio de unión a ADN. Por tanto, su efecto en la transcripción de *igaA* también debe ser indirecto. Nuestros resultados sugieren que este efecto está mediado por RpoS, lo que está de acuerdo con el papel que se sabe que tiene MviA en el control de la estabilidad de este factor sigma alternativo (Bearson *et al.* 1996, Muffler *et al.* 1996, Pratt y Silhavy 1996, Swords *et al.* 1997). La mutación *rpoS*, además de suprimir el efecto de la mutación *mviA*, aumenta la transcripción de *igaA* por encima de los niveles que tiene en la estirpe silvestre. Se pueden proponer al menos dos hipótesis para explicar el efecto negativo de RpoS sobre un operón dependiente de σ^{70} :

1. RpoS podría ser necesario para la transcripción de un represor de *igaA*.
2. RpoS podría competir con σ^{70} por la ARN polimerasa. La competición entre factores sigma no es una idea nueva (Zhou y Gross 1992), y se ha propuesto como un mecanismo general para explicar la represión dependiente de RpoS de genes dependientes de σ^{70} (Farewell *et al.* 1998, Nystrom 2004).

MviA actúa como un adaptador de la proteasa ClpX y su acción está controlada por proteínas denominadas antiadaptadores (Bougdour *et al.* 2008). Se sabe que H-NS regula negativamente uno de esos antiadaptadores (Zhou y Gottesman 2006), mientras que el sistema PhoPQ regula positivamente otro de ellos (Tu *et al.* 2006). Esto es coherente con nuestros resultados que indican que tanto H-NS como PhoP regulan a *igaA*. Ello apoya la idea de que *igaA* está regulado por MviA y por RpoS.

La única función conocida de IgaA es mantener inactivo el sistema Rcs. Sería de esperar que la mutación *mviA*, al bajar los niveles de IgaA, activara el sistema Rcs. Varios datos presentados en esta Tesis así lo sugieren: los fenotipos de avirulencia, falta de movilidad, represión de genes de flagelo y colonia pequeña que presenta el mutante *mviA* se suprimen, al menos parcialmente, por una mutación *rscB*. Sobre esta base se puede proponer un modelo en el que RpoS regula la transcripción del operón *igaA* por competencia con el factor σ^{70} . MviA controla positivamente a *igaA* a través de la degradación de RpoS. H-NS y PhoP se incorporarían al modelo controlando la expresión de antiadaptadores que antagonizan con MviA. Aunque la mayoría de nuestros datos son coherentes con este modelo, hay datos que no encajan: la represión de los genes de flagelo que se observa en el mutante *mviA* se suprime por una mutación *rscB* pero no por una mutación *rpoS*, ni por una mutación nula *rscC*, ni sobreexpresando *igaA* desde un plásmido. Estos resultados se pueden explicar asumiendo que MviA pueda inactivar a RcsB de una

manera independiente de RpoS, IgaA y RcsC. La idea de que MviA no actúa exclusivamente a través de RpoS es coherente con datos previos obtenidos en *Erwinia carotovora*. En este patógeno de plantas, el ortólogo de *mviA* se denomina *expM*. Un mutante en este gen presenta atenuación en tabaco y tiene alterada la secreción de ciertas enzimas extracelulares (Andersson *et al.* 1999). El aumento en los niveles de RpoS es un factor importante para explicar estos fenotipos pero no el único, ya que un doble mutante *expM rpoS* sigue siendo menos virulento que la estirpe silvestre y sigue presentando un defecto en secreción, lo que sugiere que ExpM puede actuar sobre otras dianas distintas de RpoS (Andersson *et al.* 1999). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis, RcsB podría ser una de esas dianas. Es interesante señalar que algunos de los fenotipos observados para el mutante *mviA* podrían ser el resultado del efecto simultáneo sobre más de una diana. Por ejemplo, el fenotipo de colonia pequeña se suprime, al menos parcialmente, tanto por una mutación *rpoS* como por una mutación *rscB* (pero no por una mutación *rscC*), lo que indica que para tener ese fenotipo es necesario incrementar los niveles de RpoS y además activar RcsB. Existen al menos tres hipótesis para explicar este efecto de MviA sobre RcsB:

1. MviA afecta a la activación de RcsB por una vía independiente de RpoS, IgaA y RcsC, tal vez a través de una histidina kinasa que habitualmente actúa en otro sistema de dos componentes o a través de acetil fosfato.
2. MviA actúa como un represor transcripcional del gen *rscB*.
3. MviA altera los niveles de la proteína RcsB favoreciendo su degradación.

Para entender las hipótesis 2 y 3 hay que tener en cuenta que la sobreexpresión de *rscB* por sí sola es equivalente a la activación de la proteína RcsB, fenómeno en que se basó uno de los escrutinios del capítulo 2. La hipótesis 3 estaría más en consonancia con la función conocida de MviA para el caso de RpoS. El análisis mediante *inmunoblot* de los niveles de la proteína RcsB es coherente con la tercera hipótesis y

sugiere un papel de MviA en el control de RcsB análogo al que tiene sobre la degradación de RpoS.

Un posible modelo de regulación sería el siguiente:

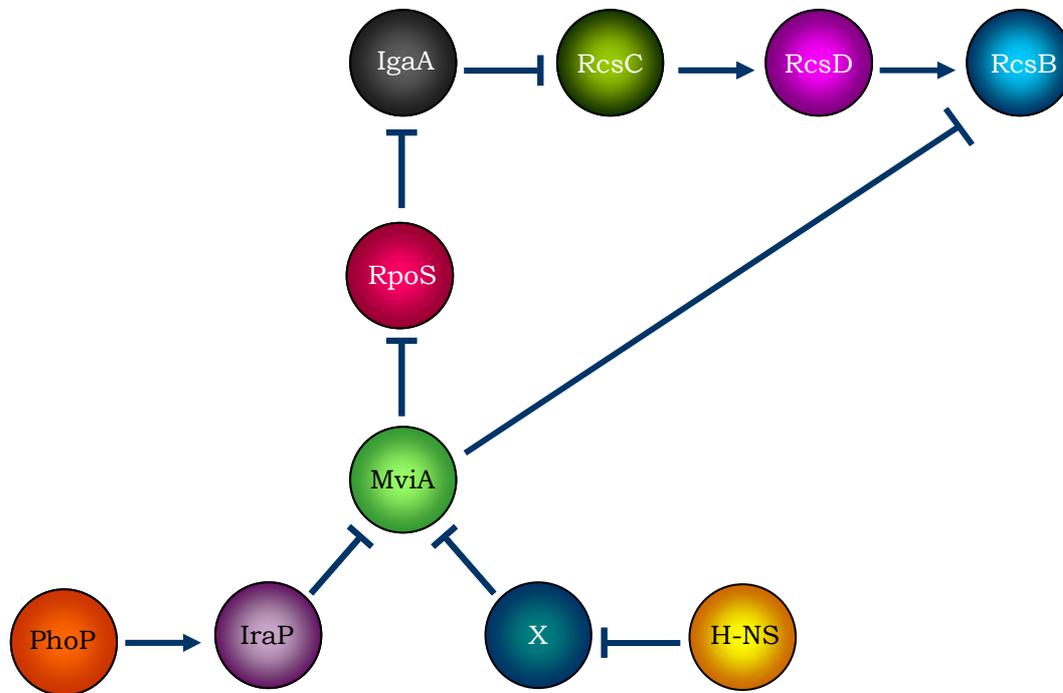


Figura D.1. Modelo de regulación del sistema Rcs y la proteína IgaA por elementos externos al sistema, y regulación entre ellos.

CONCLUSIONES

1. En una colección de 24 mutantes *rscC* constitutivos se han encontrado 11 sustituciones aminoacídicas en la región citoplásmica de la proteína. Mutaciones recesivas en el dominio histidina quinasa (dominio transmisor) y mutaciones dominantes en el dominio receptor son las que causan mayor activación del sistema Rcs.
2. Dos escrutinios genéticos diseñados para detectar nuevos genes regulados por el sistema Rcs han identificado genes previamente descritos en *E. coli* y loci específicos de *Salmonella*, entre los que se encuentran *bapA*, *siiE*, *srfA* y *srfB*.
3. El operón *srfABC* de *S. enterica* está reprimido por el sistema Rcs y por el sistema PhoPQ. Ello sugiere un solapamiento parcial entre los sistemas Rcs y PhoPQ en el control de la virulencia de *Salmonella*.
4. La proteína SrfC se secreta a través del sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 1.
5. El gen *igaA* es el primer gen de un operón que incluye cuatro genes, transcrito desde un promotor dependiente de σ^{70} .
6. La transcripción de *igaA* está regulada de manera indirecta tanto por la proteasa Lon como por el regulador de respuesta MviA.
7. MviA controla la actividad del sistema Rcs de dos formas: (1) regulando la transcripción de *igaA*, por una vía dependiente de RpoS, y (2) alterando los niveles de la proteína RcsB de manera independiente de IgaA, RpoS y RcsC.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adler, H. I. and A. A. Hardigree.** 1964. *Analysis of a Gene Controlling Cell Division and Sensitivity to Radiation in Escherichia coli.* J Bacteriol **87**:720-726.
2. **Aiba, H., T. Mizuno and S. Mizushima.** 1989. *Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the ompF and ompC genes in Escherichia coli.* J Biol Chem **264**:8563-8567.
3. **Altier, C., M. Suyemoto and S. D. Lawhon.** 2000. *Regulation of Salmonella enterica serovar typhimurium invasion genes by csrA.* Infect Immun **68**:6790-6797.
4. **Andersen, C.** 2003. *Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria.* Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg. **17**:122-165.
5. **Andersson, R. A., E. T. Palva and M. Pirhonen.** 1999. *The response regulator expM is essential for the virulence of Erwinia carotovora subsp. carotovora and acts negatively on the sigma factor RpoS (sigma s).* Mol Plant Microbe Interact **12**:575-584.
6. **Appleby, J. L. and R. B. Bourret.** 1998. *Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet.* J Bacteriol **180**:3563-3569.
7. **Bajaj, V., C. Hwang and C. A. Lee.** 1995. *hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of Salmonella typhimurium invasion genes.* Mol Microbiol **18**:715-727.
8. **Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang and C. A. Lee.** 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.
9. **Ban, C. and W. Yang.** 1998. *Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis.* Cell **95**:541-552.
10. **Barth, M., C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer and R. Hengge-Aronis.** 1995. *Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in Escherichia coli.* J Bacteriol **177**:3455-3464.
11. **Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeiffer, H. Russmann and W. D. Hardt.** 2003. *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host.* Infect Immun **71**:2839-2858.
12. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, T. A. Ficht and L. G. Adams.** 1998. *Evolution of host adaptation in Salmonella enterica.* Infect Immun **66**:4579-4587.
13. **Bearson, S. M., W. H. Benjamin, Jr., W. E. Swords and J. W. Foster.** 1996. *Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of Salmonella typhimurium.* J Bacteriol **178**:2572-2579.
14. **Beier, D. and R. Gross.** 2006. *Regulation of bacterial virulence by two-component systems.* Curr Opin Microbiol **9**:143-152.
15. **Bellamy, R.** 1999. *The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens.* Microbes Infect **1**:23-27.
16. **Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., J. D. Goguen, B. S. Posey and D. E. Briles.** 1986. *Genetic mapping of novel virulence determinants of Salmonella typhimurium to the region between trpD and supD.* Microb Pathog **1**:115-124.

17. **Benjamin, W. H., Jr., X. Wu and W. E. Swords.** 1996. *The predicted amino acid sequence of the Salmonella typhimurium virulence gene mviAA(+) strongly indicates that MviA is a regulator protein of a previously unknown S. typhimurium response regulator family.* Infect Immun **64**:2365-2367.
18. **Benjamin, W. H., Jr., J. Yother, P. Hall and D. E. Briles.** 1991. *The Salmonella typhimurium locus mviA regulates virulence in Itys but not Ityr mice: functional mviA results in avirulence; mutant (nonfunctional) mviA results in virulence.* J Exp Med **174**:1073-1083.
19. **Bensadoun, A. and D. Weinstein.** 1976. *Assay of proteins in the presence of interfering materials.* Anal Biochem **70**:241-250.
20. **Bernadac, A., M. Gavioli, J. C. Lazzaroni, S. Raina and R. Llobes.** 1998. *Escherichia coli tol-pal mutants form outer membrane vesicles.* J Bacteriol **180**:4872-4878.
21. **Beuzón, C. R. and D. W. Holden.** 2001. *Use of mixed infections with Salmonella strains to study virulence genes and their interactions in vivo.* Microbes Infect **3**:1345-1352.
22. **Beuzón, C. R., K. E. Unsworth and D. W. Holden.** 2001. *In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system contribute independently to Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence.* Infect Immun **69**:7254-7261.
23. **Bijlsma, J. J. and E. A. Groisman.** 2003. *Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems.* Trends Microbiol **11**:359-366.
24. **Bijlsma, J. J. and E. A. Groisman.** 2005. *The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica.* Mol Microbiol **57**:85-96.
25. **Birck, C., L. Mourey, P. Gouet, B. Fabry, J. Schumacher, P. Rousseau, D. Kahn and J. P. Samama.** 1999. *Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain.* Structure **7**:1505-1515.
26. **Birnboim, H. C.** 1983. *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.* Methods Enzymol **100**:243-255.
27. **Blasco, F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chippaux and V. Bonnefoy.** 1989. *Nitrate reductase of Escherichia coli: completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer.* Mol Gen Genet **218**:249-256.
28. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao.** 1997. *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science **277**:1453-1474.
29. **Bouche, S., E. Klauck, D. Fischer, M. Lucassen, K. Jung and R. Hengge-Aronis.** 1998. *Regulation of RssB-dependent proteolysis in Escherichia coli: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process.* Mol Microbiol **27**:787-795.
30. **Bougdour, A., C. Cuning, P. J. Baptiste, T. Elliott and S. Gottesman.** 2008. *Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in Escherichia coli via the action of multiple anti-adaptors.* Mol Microbiol **68**:298-313.
31. **Bourret, R. B., J. F. Hess, K. A. Borkovich, A. A. Pakula and M. I. Simon.** 1989. *Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria.* J Biol Chem **264**:7085-7088.

32. **Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam and R. K. Selander.** 1996. *Molecular genetic relationships of the salmonellae.* Appl Environ Microbiol **62**:804-808.
33. **Brandtzaeg, P.** 1989. *Overview of the mucosal immune system.* Curr Top Microbiol Immunol **146**:13-25.
34. **Brill, J. A., C. Quinlan-Walshe and S. Gottesman.** 1988. *Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **170**:2599-2611.
35. **Brissette, R. E., K. L. Tsung and M. Inouye.** 1991. *Intramolecular second-site revertants to the phosphorylation site mutation in OmpR, a kinase-dependent transcriptional activator in Escherichia coli.* J Bacteriol **173**:3749-3755.
36. **Bukhari, A. I. and D. Zipser.** 1973. *Mutants of Escherichia coli with a defect in the degradation of nonsense fragments.* Nat New Biol **243**:238-241.
37. **Camacho, E. M. and J. Casadesús.** 2001. *Genetic mapping by duplication segregation in Salmonella enterica.* Genetics **157**:491-502.
38. **Camacho, E. M. and J. Casadesús.** 2002. *Conjugal transfer of the virulence plasmid of Salmonella enterica is regulated by the leucine-responsive regulatory protein and DNA adenine methylation.* Mol Microbiol **44**:1589-1598.
39. **Cano, D. A., G. Domínguez-Bernal, A. Tiérrez, F. García-Del Portillo and J. Casadesús.** 2002. *Regulation of capsule synthesis and cell motility in Salmonella enterica by the essential gene igaA.* Genetics **162**:1513-1523.
40. **Cano, D. A., M. Martínez-Moya, M. G. Pucciarelli, E. A. Groisman, J. Casadesús and F. García-Del Portillo.** 2001. *Salmonella enterica serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation.* Infect Immun **69**:6463-6474.
41. **Carballès, F., C. Bertrand, J. P. Bouché and K. Cam.** 1999. *Regulation of Escherichia coli cell division genes ftsA and ftsZ by the two-component system rcsC-rcsB.* Mol Microbiol **34**:442-450.
42. **Casadaban, M. J. and S. N. Cohen.** 1979. *Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences.* Proc Natl Acad Sci U S A **76**:4530-4533.
43. **Casadaban, M. J. and J. Chou.** 1984. *In vivo formation of gene fusions encoding hybrid beta-galactosidase proteins in one step with a transposable Mu-lac transducing phage.* Proc Natl Acad Sci U S A **81**:535-539.
44. **Castilho, B. A., P. Olfson and M. J. Casadaban.** 1984. *Plasmid insertion mutagenesis and lac gene fusion with mini-mu bacteriophage transposons.* J Bacteriol **158**:488-495.
45. **Claret, L. and C. Hughes.** 2000. *Functions of the subunits in the FlhD(2)C(2) transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming.* J Mol Biol **303**:467-478.
46. **Clarke, D. J., S. A. Joyce, C. M. Toutain, A. Jacq and I. B. Holland.** 2002. *Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **184**:1204-1208.
47. **Coburn, B., Y. Li, D. Owen, B. A. Vallance and B. B. Finlay.** 2005. *Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis.* Infect Immun **73**:3219-3227.

48. **Coombes, B. K., N. F. Brown, Y. Valdez, J. H. Brumell and B. B. Finlay.** 2004. *Expression and secretion of Salmonella pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL.* J Biol Chem **279**:49804-49815.
49. **Costa, C. S. and D. N. Antón.** 2001. *Role of the ftsA1p promoter in the resistance of mucoid mutants of Salmonella enterica to mecillinam: characterization of a new type of mucoid mutant.* FEMS Microbiol Lett **200**:201-205.
50. **Costa, C. S., M. J. Pettinari, B. S. Méndez and D. N. Antón.** 2003. *Null mutations in the essential gene yrfF (mucM) are not lethal in rcsB, yojN or rcsC strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* FEMS Microbiol Lett **222**:25-32.
51. **Cozzone, A. J.** 1988. *Protein phosphorylation in prokaryotes.* Annu Rev Microbiol **42**:97-125.
52. **Cunning, C. and T. Elliott.** 1999. *RpoS synthesis is growth rate regulated in Salmonella typhimurium, but its turnover is not dependent on acetyl phosphate synthesis or PTS function.* J Bacteriol **181**:4853-4862.
53. **Cho, H. S., S. Y. Lee, D. Yan, X. Pan, J. S. Parkinson, S. Kustu, D. E. Wemmer and J. G. Pelton.** 2000. *NMR structure of activated CheY.* J. Mol. Biol. **297**:543-551.
54. **Chung, C. H. and A. L. Goldberg.** 1981. *The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La.* Proc Natl Acad Sci U S A **78**:4931-4935.
55. **Danese, P. N., L. A. Pratt and R. Kolter.** 2000. *Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture.* J Bacteriol **182**:3593-3596.
56. **Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 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.
57. **Davalos-Garcia, M., A. Conter, I. Toesca, C. Gutierrez and K. Cam.** 2001. *Regulation of osmC gene expression by the two-component system rcsB-rcsC in Escherichia coli.* J Bacteriol **183**:5870-5876.
58. **Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan and M. Hensel.** 1999. *Environmental regulation of Salmonella pathogenicity island 2 gene expression.* Mol Microbiol **31**:1759-1773.
59. **Dominguez-Bernal, G., M. G. Pucciarelli, F. Ramos-Morales, M. García-Quintanilla, D. A. Cano, J. Casadesús and F. García-del Portillo.** 2004. *Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for Salmonella virulence.* Mol Microbiol **53**:1437-1449.
60. **Dutta, U., P. K. Garg, R. Kumar and R. K. Tandon.** 2000. *Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder.* Am J Gastroenterol **95**:784-787.
61. **Ebel, W., G. J. Vaughn, H. K. Peters, 3rd and J. E. Trempy.** 1997. *Inactivation of mdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in Escherichia coli.* J Bacteriol **179**:6858-6561.
62. **Eguchi, Y. and R. Utsumi.** 2005. *A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems.* Trends Biochem Sci **30**:70-72.
63. **Ehrbar, K., S. Miold, A. Friebel, S. Stender and W. D. Hardt.** 2002. *Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of Salmonella typhimurium.* Int J Med Microbiol **291**:479-485.

64. **Elsinghorst, E. A.** 1994. *Measurement of invasion by gentamicin resistance.* Methods Enzymol. **236**:405-420.
65. **Ellermeier, C. D., J. R. Ellermeier and J. M. Slauch.** 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.
66. **Ellermeier, C. D., A. Janakiraman and J. M. Slauch.** 2002. *Construction of targeted single copy lac fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria.* Gene **290**:153-161.
67. **Elliott, T. and J. R. Roth.** 1988. *Characterization of Tn10d-Cam: a transposition-defective Tn10 specifying chloramphenicol resistance.* Mol Gen Genet **213**:332-338.
68. **Ermolaeva, M. D., O. White and S. L. Salzberg.** 2001. *Prediction of operons in microbial genomes.* Nucleic Acids Res **29**:1216-1221.
69. **Fabret, C., V. A. Feher and J. A. Hoch.** 1999. *Two-component signal transduction in Bacillus subtilis: how one organism sees its world.* J Bacteriol **181**:1975-1983.
70. **Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood and D. G. Guiney.** 1992. *The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates Salmonella virulence.* Proc Natl Acad Sci U S A **89**:11978-11982.
71. **Farewell, A., K. Kvint and T. Nystrom.** 1998. *Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition.* Mol Microbiol **29**:1039-1051.
72. **Feng, X., R. Oropeza and L. J. Kenney.** 2003. *Dual regulation by phospho-OmpR of ssrA/B gene expression in Salmonella pathogenicity island 2.* Mol Microbiol **48**:1131-1143.
73. **Feng, X., D. Walthers, R. Oropeza and L. J. Kenney.** 2004. *The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at Salmonella pathogenicity island 2.* Mol Microbiol **54**:823-835.
74. **Ferrières, L., S. N. Aslam, R. M. Cooper and D. J. Clarke.** 2007. *The yjbEFGH locus in Escherichia coli K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production.* Microbiology **153**:1070-1080.
75. **Ferrières, L. and D. J. Clarke.** 2003. *The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in Escherichia coli K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface.* Mol Microbiol **50**:1665-1682.
76. **Fields, P. I., E. A. Groisman and F. Heffron.** 1989. *A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells.* Science **243**:1059-1062.
77. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris and F. Heffron.** 1986. *Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent.* Proc Natl Acad Sci U S A **83**:5189-5193.
78. **Figuroa-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol and L. Bossi.** 2001. *Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella.* Mol Microbiol **39**:260-271.
79. **Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M. P. Castanie-Cornet, C. Gutierrez and K. Cam.** 2003. *RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in Escherichia coli.* Mol Microbiol **49**:823-832.
80. **Freter, R., P. C. O'Brien and M. S. Macsai.** 1981. *Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies.* Infect Immun **34**:234-240.

81. **Frye, J., J. E. Karlinsey, H. R. Felise, B. Marzolf, N. Dowidar, M. McClelland and K. T. Hughes.** 2006. *Identification of new flagellar genes of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* J Bacteriol **188**:2233-2243.
82. **Furness, R. B., G. M. Fraser, N. A. Hay and C. Hughes.** 1997. *Negative feedback from a Proteus class II flagellum export defect to the flhDC master operon controlling cell division and flagellum assembly.* J Bacteriol **179**:5585-5588.
83. **Galán, J. E. and R. Curtiss, 3rd.** 1989. *Virulence and vaccine potential of phoP mutants of Salmonella typhimurium.* Microb Pathog **6**:433-443.
84. **Galán, J. E. and D. Zhou.** 2000. *Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella.* Proc Natl Acad Sci U S A **97**:8754-8761.
85. **Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges and T. S. Wallis.** 1997. *A secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa.* Mol Microbiol **25**:903-912.
86. **García-Calderón, C. B., M. García-Quintanilla, J. Casadesús and F. Ramos-Morales.** 2005. *Virulence attenuation in Salmonella enterica rcsC mutants with constitutive activation of the Rcs system.* Microbiology **151**:579-588.
87. **Gervais, F. G. and G. R. Drapeau.** 1992. *Identification, cloning, and characterization of rcsF, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation ftsZ84 in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **174**:8016-8022.
88. **Gervais, F. G., P. Phoenix and G. R. Drapeau.** 1992. *The rcsB gene, a positive regulator of colanic acid biosynthesis in Escherichia coli, is also an activator of ftsZ expression.* J Bacteriol **174**:3964-3971.
89. **Gillen, K. L. and K. T. Hughes.** 1991. *Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in Salmonella typhimurium.* J Bacteriol **173**:2301-2310.
90. **Givaudan, A. and A. Lanois.** 2000. *flhDC, the flagellar master operon of Xenorhabdus nematophilus: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects.* J Bacteriol **182**:107-115.
91. **Golby, P., D. J. Kelly, J. R. Guest and S. C. Andrews.** 1998. *Transcriptional regulation and organization of the dcuA and dcuB genes, encoding homologous anaerobic C4-dicarboxylate transporters in Escherichia coli.* J Bacteriol **180**:6586-6596.
92. **Gottesman, S.** 1995. *Regulation of capsule synthesis: modification of the two-component paradigm by an accessory unstable regulator.* In *Two-Component Signal Transduction*, Washington D.C: American Society for Microbiology.
93. **Gottesman, S. and V. Stout.** 1991. *Regulation of capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K12.* Mol Microbiol **5**:1599-1606.
94. **Gottesman, S., P. Trisler and A. Torres-Cabassa.** 1985. *Regulation of capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K-12: characterization of three regulatory genes.* J Bacteriol **162**:1111-1119.
95. **Govoni, G. and P. Gros.** 1998. *Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections.* Inflamm Res **47**:277-284.
96. **Grebe, T. W. and J. Stock.** 1998. *Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium.* Curr Biol **8**:R154-157.
97. **Groisman, E. A.** 2001. *The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ.* J Bacteriol **183**:1835-1842.
98. **Groisman, E. A. and H. Ochman.** 1994. *How to become a pathogen.* Trends Microbiol **2**:289-294.

99. **Groisman, E. A. and H. Ochman.** 1996. *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps.* Cell **87**:791-794.
100. **Groisman, E. A. and H. Ochman.** 1997. *How Salmonella became a pathogen.* Trends Microbiol **5**:343-349.
101. **Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins and P. Gros.** 1997. *Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome.* J Exp Med **185**:717-730.
102. **Guex, N. and M. C. Peitsch.** 1997. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.* Electrophoresis **18**:2714-2723.
103. **Gulig, P. A., H. Danbara, D. G. Guiney, A. J. Lax, F. Norel and M. Rhen.** 1993. *Molecular analysis of spv virulence genes of the Salmonella virulence plasmids.* Mol Microbiol **7**:825-830.
104. **Gunn, J. S., S. S. Ryan, J. C. Van Velkinburgh, R. K. Ernst and S. I. Miller.** 2000. *Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium.* Infect Immun **68**:6139-6146.
105. **Gupta, A.** 1999. *RT-PCR: characterization of long multi-gene operons and multiple transcript gene clusters in bacteria.* Biotechniques **27**:966-970, 972.
106. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith.** 1995. *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.* J Bacteriol **177**:4121-4130.
107. **Gygi, D., M. J. Bailey, C. Allison and C. Hughes.** 1995. *Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by Proteus mirabilis.* Mol Microbiol **15**:761-769.
108. **Hacker, J. and J. B. Kaper.** 2000. *Pathogenicity islands and the evolution of microbes.* Annu Rev Microbiol **54**:641-679.
109. **Hagiwara, D., M. Sugiura, T. Oshima, H. Mori, H. Aiba, T. Yamashino and T. Mizuno.** 2003. *Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in Escherichia coli.* J Bacteriol **185**:5735-5746.
110. **Halkides, C. J., M. M. McEvoy, E. Casper, P. Matsumura, K. Volz and F. W. Dahlquist.** 2000. *The 1.9 Å resolution crystal structure of phosphono-CheY, an analogue of the active form of the response regulator, CheY.* Biochemistry **39**:5280-5286.
111. **Han, D. C., C. Y. Chen, Y. F. Chen and S. C. Winans.** 1992. *Altered-function mutations of the transcriptional regulatory gene virG of Agrobacterium tumefaciens.* J. Bacteriol. **174**:7040-7043.
112. **Hanahan, D.** 1983. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol **166**:557-580.
113. **Hansen-Wester, I., B. Stecher and M. Hensel.** 2002. *Type III secretion of Salmonella enterica serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG.* Infect Immun **70**:1403-1409.
114. **Hapfelmeier, S. and W. D. Hardt.** 2005. *A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis.* Trends Microbiol **13**:497-503.
115. **Harshey, R. M.** 2003. *Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal.* Annu Rev Microbiol **57**:249-273.
116. **Hautefort, I., A. Thompson, S. Eriksson-Ygberg, M. L. Parker, S. Lucchini, V. Danino, R. J. Bongaerts, N. Ahmad, M. Rhen and J. C. Hinton.** 2008. *During infection of epithelial cells Salmonella enterica serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional*

- adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**:958-984.
117. **Headley, V. L. and S. M. Payne.** 1990. Differential protein expression by *Shigella flexneri* in intracellular and extracellular environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4179-4183.
 118. **Hensel, M.** 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**:95-102.
 119. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-403.
 120. **Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow and A. Zychlinsky.** 1999. The *Salmonella* invasin *SipB* induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2396-2401.
 121. **Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**:165-170.
 122. **Hoch, J. A. and K. I. Varughese.** 2001. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol* **183**:4941-4949.
 123. **Holmes, D. S. and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**:193-197.
 124. **Howard-Flanders, P., E. Simson and L. Theriot.** 1964. A Locus That Controls Filament Formation and Sensitivity to Radiation in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **49**:237-246.
 125. **Huang, Y. H., L. Ferrières and D. J. Clarke.** 2006. The role of the Rcs phosphorelay in *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol* **157**:206-212.
 126. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379-433.
 127. **Hughes, K. T. and J. R. Roth.** 1988. Transitory cis complementation: a method for providing transposition functions to defective transposons. *Genetics* **119**:9-12.
 128. **Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
 129. **Jin, S., Y. Song, S. Q. Pan and E. W. Nester.** 1993. Characterization of a *virG* mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **7**:555-562.
 130. **Jones, B. D., N. Ghori and S. Falkow.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**:15-23.
 131. **Jones, G. W., D. K. Rabert, D. M. Svinarich and H. J. Whitfield.** 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* **38**:476-486.
 132. **Kato, A. and E. A. Groisman.** 2004. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev* **18**:2302-2313.
 133. **Keener, J. and S. Kustu.** 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4976-4980.
 134. **Kern, D., B. F. Volkman, P. Luginbuhl, M. J. Nohaile, S. Kustu and D. E. Wemmer.** 1999. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature* **402**:894-898.
 135. **Khorchid, A. and M. Ikura.** 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:307-312.

136. **Klauck, E., M. Lingnau and R. Hengge-Aronis.** 2001. *Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in Escherichia coli.* Mol Microbiol **40**:1381-1390.
137. **Kleckner, N., J. Bender and S. Gottesman.** 1991. *Uses of transposons with emphasis on Tn10.* Methods Enzymol **204**:139-180.
138. **Kox, L. F., M. M. Wösten and E. A. Groisman.** 2000. *A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system.* EMBO **19**:1861-1872.
139. **Kuhle, V. and M. Hensel.** 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.
140. **Kuo, M. S., K. P. Chen and W. F. Wu.** 2004. *Regulation of RcsA by the ClpYQ (HslUV) protease in Escherichia coli.* Microbiology **150**:437-446.
141. **Kutsukake, K., Y. Ohya and T. Iino.** 1990. *Transcriptional analysis of the flagellar regulon of Salmonella typhimurium.* J Bacteriol **172**:741-747.
142. **Laemmli, U. K.** 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature **227**:680-685.
143. **Lai, C. W., R. C. Chan, A. F. Cheng, J. Y. Sung and J. W. Leung.** 1992. *Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis.* Am J Gastroenterol **87**:1198-1199.
144. **Lalitha, M. K. and R. John.** 1994. *Unusual manifestations of salmonellosis--a surgical problem.* Q J Med **87**:301-309.
145. **Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J. M. Ghigo, C. Gamazo, J. R. Penadés and I. Lasa.** 2005. *BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis.* Mol Microbiol **58**:1322-1339.
146. **Laub, M. T. and M. Goulian.** 2007. *Specificity in two-component signal transduction pathways.* Annu Rev Genet **41**:121-145.
147. **Lavigne, J. P. and A. B. Blanc-Potard.** 2008. *Molecular evolution of Salmonella enterica serovar Typhimurium and pathogenic Escherichia coli: from pathogenesis to therapeutics.* Infect Genet Evol **8**:217-226.
148. **Lawhon, S. D., R. Maurer, M. Suyemoto and C. Altier.** 2002. *Intestinal short-chain fatty acids alter Salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA.* Mol Microbiol **46**:1451-1464.
149. **Lee, A. K., C. S. Detweiler and S. Falkow.** 2000. *OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in Salmonella pathogenicity island 2.* J Bacteriol **182**:771-781.
150. **Lee, I. and C. K. Suzuki.** 2008. *Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates.* Biochim Biophys Acta **1784**:727-735.
151. **Lee, S. Y., H. S. Cho, J. G. Pelton, D. Yan, R. K. Henderson, D. S. King, L. Huang, S. Kustu, E. A. Berry and D. E. Wemmer.** 2001. *Crystal structure of an activated response regulator bound to its target.* Nat Struct Biol **8**:52-56.
152. **Leeds, J. A. and R. A. Welch.** 1997. *Enhancing transcription through the Escherichia coli hemolysin operon, hlyCABD: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism.* J Bacteriol **179**:3519-3527.
153. **Lillengen, K.** 1948. *Typing Salmonella typhimurium by means of bacteriophage.* Acta Pathol Microbiol Scand Suppl **77**:11-125.
154. **Lois, A. F., M. Weinstein, G. S. Ditta and D. R. Helinski.** 1993. *Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing*

- protein FixL of Rhizobium meliloti are coordinately regulated by oxygen.* J Biol Chem **268**:4370-4375.
155. **Loistroh, C. P. and C. A. Lee.** 2001. *The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system.* Microbes Infect **3**:1281-1291.
 156. **Lucas, R. L. and C. A. Lee.** 2001. *Roles of hilC and hilD in regulation of hilA expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* J Bacteriol **183**:2733-2745.
 157. **Lukat, G. S., B. H. Lee, J. M. Mottonen, A. M. Stock and J. B. Stock.** 1991. *Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis.* J. Biol. Chem. **266**:8348-8354.
 158. **Macián, F., I. Pérez-Roger and M. E. Armengod.** 1994. *An improved vector system for constructing transcriptional lacZ fusions: analysis of regulation of the dnaA, dnaN, recF and gyrB genes of Escherichia coli.* Gene **145**:17-24.
 159. **Macnab, R. M.** 1996. *Flagella and motility.* In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F. C. Neidhardt and others ed, Washington, D.C: American Society for Microbiology.
 160. **Majdalani, N. and S. Gottesman.** 2005. *The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system.* Annu Rev Microbiol **59**:379-405.
 161. **Majdalani, N., M. Heck, V. Stout and S. Gottesman.** 2005. *Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli.* J Bacteriol **187**:6770-6778.
 162. **Majdalani, N., D. Hernandez and S. Gottesman.** 2002. *Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA.* Mol Microbiol **46**:813-826.
 163. **Maloy, S. R.** 1990. *Experimental techniques in bacterial genetics.* Boston: Jones and Bartlett.
 164. **Maloy, S. R., V. J. Stewart and R. K. Taylor.** 1996. *Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 165. **Manzanera, M., I. Aranda-Olmedo, J. L. Ramos and S. Marqués.** 2001. *Molecular characterization of Pseudomonas putida KT2440 rpoH gene regulation.* Microbiology **147**:1323-1330.
 166. **Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin and S. H. Bryant.** 2003. *CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments.* Nucleic Acids Res **31**:383-7.
 167. **Mariscotti, J. F. and F. García-Del Portillo.** 2008. *Instability of the Salmonella RcsCDB signalling system in the absence of the attenuator IgaA.* Microbiology **154**:1372-1383.
 168. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston and R. K. Wilson.** 2001. *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2.* Nature **413**:852-856.
 169. **McPherson, M. J. and S. G. Møller.** 2000. *PCR.* BIOS Scientific Publisher Limited.

170. **Miao, E. A. and S. I. Miller.** 2000. *A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A **97**:7539-7544.
171. **Mika, F. and R. Hengge.** 2005. *A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in E. coli.* Genes Dev **19**:2770-2781.
172. **Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
173. **Miller, S. I., A. M. Kukral and J. J. Mekalanos.** 1989. *A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence.* Proc Natl Acad Sci U S A **86**:5054-5058.
174. **Miller, S. I. and J. J. Mekalanos.** 1990. *Constitutive expression of the phoP regulon attenuates Salmonella virulence and survival within macrophages.* J Bacteriol **172**:2485-2490.
175. **Mills, D. M., V. Bajaj and C. A. Lee.** 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.
176. **Mizusaki, H., A. Takaya, T. Yamamoto and S. Aizawa.** 2008. *Signal pathway in salt-activated expression of the Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* J Bacteriol **190**:4624-4631.
177. **Mizushima, K., S. Awakihara, M. Kuroda, T. Ishikawa, M. Tsuda and T. Tsuchiya.** 1992. *Cloning and sequencing of the melB gene encoding the melibiose permease of Salmonella typhimurium LT2.* Mol Gen Genet **234**:74-80.
178. **Morgan, E., A. J. Bowen, S. C. Carnell, T. S. Wallis and M. P. Stevens.** 2007. *SiiE is secreted by the Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle.* Infect Immun **75**:1524-1533.
179. **Morgan, E., J. D. Campbell, S. C. Rowe, J. Bispham, M. P. Stevens, A. J. Bowen, P. A. Barrow, D. J. Maskell and T. S. Wallis.** 2004. *Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Mol Microbiol **54**:994-1010.
180. **Mouslim, C., M. Delgado and E. A. Groisman.** 2004. *Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates Salmonella virulence.* Mol Microbiol **54**:386-395.
181. **Mouslim, C. and E. A. Groisman.** 2003. *Control of the Salmonella ugd gene by three two-component regulatory systems.* Mol Microbiol **47**:335-344.
182. **Mouslim, C., T. Latifi and E. A. Groisman.** 2003. *Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated ugd gene.* J Biol Chem **278**:50588-50595.
183. **Muffler, A., D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz and R. Hengge-Aronis.** 1996. *The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in Escherichia coli.* Embo J **15**:1333-1339.
184. **Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel and P. J. Sansonetti.** 1989. *Mucoid phenotype of Klebsiella pneumoniae is a plasmid-encoded virulence factor.* Infect Immun **57**:546-552.
185. **Navarre, W. W., T. A. Halsey, D. Walthers, J. Frye, M. McClelland, J. L. Potter, L. J. Kenney, J. S. Gunn, F. C. Fang and S. J. Libby.** 2005. *Co-regulation of Salmonella enterica genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ.* Mol Microbiol **56**:492-508.

186. **Nixon, B. T., C. W. Ronson and F. M. Ausubel.** 1986. *Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC.* Proc Natl Acad Sci U S A **83**:7850-7854.
187. **Nystrom, T.** 2004. *Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition?* Mol Microbiol **54**:855-862.
188. **Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon and E. A. Groisman.** 1996. *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells.* Proc Natl Acad Sci U S A **93**:7800-7804.
189. **Ohl, M. E. and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella: a model for bacterial pathogenesis.* Annu Rev Med **52**:259-274.
190. **Okada, T., K. Ueyama, S. Niiya, H. Kanazawa, M. Futai and T. Tsuchiya.** 1981. *Role of inducer exclusion in preferential utilization of glucose over melibiose in diauxic growth of Escherichia coli.* J Bacteriol **146**:1030-1037.
191. **Ophir, T. and D. L. Gutnick.** 1994. *A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation.* Appl Environ Microbiol **60**:740-745.
192. **Oshima, T., H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, B. L. Wanner, H. Mori and T. Mizuno.** 2002. *Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of Escherichia coli K-12.* Mol Microbiol **46**:281-291.
193. **Parker, C. T., A. W. Kloser, C. A. Schnaitman, M. A. Stein, S. Gottesman and B. W. Gibson.** 1992. *Role of the rfaG and rfaP genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **174**:2525-2538.
194. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebahia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead and B. G. Barrell.** 2001. *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18.* Nature **413**:848-852.
195. **Pazour, G. J., C. N. Ta and A. Das.** 1992. *Constitutive mutations of Agrobacterium tumefaciens transcriptional activator virG.* J. Bacteriol. **174**:4169-4174.
196. **Penheiter, K. L., N. Mathur, D. Giles, T. Fahlen and B. D. Jones.** 1997. *Non-invasive Salmonella typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches.* Mol Microbiol **24**:697-709.
197. **Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer and J. R. Alfano.** 2002. *Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000.* Proc Natl Acad Sci U S A **99**:7652-7657.
198. **Pratt, L. A. and T. J. Silhavy.** 1996. *The response regulator SprE controls the stability of RpoS.* Proc Natl Acad Sci U S A **93**:2488-2492.
199. **Prestidge, L. S. and A. B. Pardee.** 1965. *A second permease for Methyl-Thio-Beta-D-Galactoside in Escherichia coli.* Biochim Biophys Acta **100**:591-593.

200. **Prodromou, C., S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper and L. H. Pearl.** 1997. *Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone.* Cell **90**:65-75.
201. **Prouty, A. M., W. H. Schwesinger and J. S. Gunn.** 2002. *Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by Salmonella spp.* Infect Immun **70**:2640-2649.
202. **Pruss, B. M., J. W. Campbell, T. K. Van Dyk, C. Zhu, Y. Kogan and P. Matsumura.** 2003. *FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer.* J Bacteriol **185**:534-543.
203. **Pruss, B. M., X. Liu, W. Hendrickson and P. Matsumura.** 2001. *FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and lacZ gene fusions.* FEMS Microbiol Lett **197**:91-97.
204. **Rahn, A. and C. Whitfield.** 2003. *Transcriptional organization and regulation of the Escherichia coli K30 group 1 capsule biosynthesis (cps) gene cluster.* Mol Microbiol **47**:1045-1060.
205. **Reed, L. J. and H. Muench.** 1935. *A simple method of estimating fifty percent endpoints.* Am J Hyg **27**:493-497.
206. **Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis and J. J. Farmer, 3rd.** 1989. *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov.* J Clin Microbiol **27**:313-320.
207. **Robinson, V. L., D. R. Buckler and A. M. Stock.** 2000. *A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch.* Nat Struct Biol **7**:626-633.
208. **Rogov, V. V., F. Bernhard, F. Lohr and V. Dotsch.** 2004. *Solution structure of the Escherichia coli YojN histidine-phosphotransferase domain and its interaction with cognate phosphoryl receiver domains.* J Mol Biol **343**:1035-1048.
209. **Ronson, C. W., B. T. Nixon and F. M. Ausubel.** 1987. *Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli.* Cell **49**:579-581.
210. **Rosas Pérez, I., E. Salinas Cortés and A. O. Vargas.** 2006. *Endotoxinas, Enemigas Imperceptibles.* Ciencia y Desarrollo **32**.
211. **Rotger, R. and J. Casadesus.** 1999. *The virulence plasmids of Salmonella.* Int Microbiol **2**:177-184.
212. **Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
213. **Sanders, D. A., B. L. Gillece-Castro, A. M. Stock, A. L. Burlingame and D. E. Koshland, Jr.** 1989. *Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY.* J. Biol. Chem. **264**:21770-21778.
214. **Sanderson, K. E., A. Hessel and K. E. Rudd.** 1995. *Genetic map of Salmonella typhimurium, edition VIII.* Microbiol Rev **59**:241-303.
215. **Saurin, W., M. Hofnung and E. Dassa.** 1999. *Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters* J. Mol. Evol. **48**:22-41.
216. **Scheeren-Groot, E. P., K. W. Rodenburg, A. den Dulk-Ras, S. C. Turk and P. J. Hooykaas.** 1994. *Mutational analysis of the transcriptional activator VirG of Agrobacterium tumefaciens.* J. Bacteriol. **176**:6418-6426.
217. **Schmieger, H.** 1972. *Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.* Mol Gen Genet **119**:75-88.

218. **Schmitt, C. K., J. S. Ikeda, S. C. Darnell, P. R. Watson, J. Bispham, T. S. Wallis, D. L. Weinstein, E. S. Metcalf and A. D. O'Brien.** 2001. *Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis.* Infect Immun **69**:5619-5625.
219. **Schmitt, L. and R. Tampe.** 2002. *Structure and mechanism of ABC transporters.* Curr Opin Struct Biol **12**:754-760.
220. **Schmitt, R.** 1968. *Analysis of melibiose mutants deficient in alpha-galactosidase and thiomethylgalactoside permease II in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **96**:462-471.
221. **Segura, I., J. Casadesús and F. Ramos-Morales.** 2004. *Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of Salmonella enterica in eukaryotic cell cultures.* J Microbiol Methods **56**:83-91.
222. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson and D. W. Holden.** 1996. *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A **93**:2593-2597.
223. **Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin and D. R. Lovley.** 2004. *Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of Salmonella subterranea sp. nov.* Appl Environ Microbiol **70**:2959-2965.
224. **Shi, Y., T. Latifi, M. J. Cromie and E. A. Groisman.** 2004. *Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance ugtL gene by the Salmonella PhoP and SlyA regulatory proteins.* J Biol Chem **279**:38618-38625.
225. **Silversmith, R. E., J. G. Smith, G. P. Guanga, J. T. Les and R. B. Bourret.** 2001. *Alteration of a nonconserved active site residue in the chemotaxis response regulator CheY affects phosphorylation and interaction with CheZ.* J. Biol. Chem. **276**:18478-18484.
226. **Sledjeski, D. D. and S. Gottesman.** 1996. *Osmotic shock induction of capsule synthesis in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **178**:1204-1206.
227. **Smith, J. G., J. A. Latiolais, G. P. Guanga, J. D. Pennington, R. E. Silversmith and R. B. Bourret.** 2004. *A search for amino acid substitutions that universally activate response regulators.* Mol. Microbiol. **51**:887-901.
228. **Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs and P. R. Reeves.** 1996. *Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid.* J Bacteriol **178**:4885-4893.
229. **Stevenson, G., R. Lan and P. R. Reeves.** 2000. *The colanic acid gene cluster of Salmonella enterica has a complex history.* FEMS Microbiol Lett **191**:11-16.
230. **Stewart, R. C.** 1993. *Activating and inhibitory mutations in the regulatory domain of CheB, the methyl-esterase in bacterial chemotaxis.* J. Biol. Chem. **268**:1921-1930.
231. **Stewart, V.** 1982. *Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **151**:1320-1325.
232. **Stewart, V.** 1988. *Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria.* Microbiol Rev **52**:190-232.
233. **Stock, A. M., E. Martinez-Hackert, B. F. Rasmussen, A. H. West, J. B. Stock, D. Ringe and G. A. Petsko.** 1993. *Structure of the Mg(2+)-bound*

- form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **32**:13375-13380.
234. **Stock, A. M., V. L. Robinson and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
235. **Stock, J. B., A. J. Ninfa and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**:450-490.
236. **Stock, J. B. and M. G. Surette.** 1996. Chemotaxis. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. F. C. Neidhardt and others ed, Washington, D.C: American Society for Microbiology.
237. **Stout, V.** 1996. Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**:4273-4280.
238. **Stout, V. and S. Gottesman.** 1990. RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**:659-669.
239. **Stout, V., A. Torres-Cabassa, M. R. Maurizi, D. Gutnick and S. Gottesman.** 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol* **173**:1738-1747.
240. **Sturny, R., K. Cam, C. Gutierrez and A. Conter.** 2003. NhaR and RcsB independently regulate the *osmCp1* promoter of *Escherichia coli* at overlapping regulatory sites. *J Bacteriol* **185**:4298-4304.
241. **Swords, W. E. and W. H. Benjamin, Jr.** 1994. Mouse virulence gene A (*mviA*+) is a pleiotropic regulator of gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Ann N Y Acad Sci* **730**:295-296.
242. **Swords, W. E., B. M. Cannon and W. H. Benjamin, Jr.** 1997. Avirulence of LT2 strains of *Salmonella typhimurium* results from a defective *rpoS* gene. *Infect Immun* **65**:2451-2453.
243. **Swords, W. E., A. Giddings and W. H. Benjamin, Jr.** 1997. Bacterial phenotypes mediated by *mviA* and their relationship to the mouse virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* **22**:353-362.
244. **Takeda, S., Y. Fujisawa, M. Matsubara, H. Aiba and T. Mizuno.** 2001. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**:440-450.
245. **Tans-Kersten, J., D. Brown and C. Allen.** 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact* **17**:686-695.
246. **Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong and J. J. Mekalanos.** 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:2833-2837.
247. **Teplitski, M., R. I. Goodier and B. M. Ahmer.** 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* **185**:7257-7265.
248. **Tiérrez, A. and F. García-del Portillo.** 2004. The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *J Bacteriol* **186**:7481-7489.
249. **Tiérrez, A. and F. García-del Portillo.** 2005. New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* **7**:901-909.
250. **Tomomori, C., T. Tanaka, R. Dutta, H. Park, S. K. Saha, Y. Zhu, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Kurokawa, H. Qian, M. Inouye and M. Ikura.** 1999. Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* **6**:729-734.

251. **Torreblanca, J., S. Marqués and J. Casadesús.** 1999. *Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation.* Genetics **152**:31-45.
252. **Torres-Cabassa, A. S. and S. Gottesman.** 1987. *Capsule synthesis in Escherichia coli K-12 is regulated by proteolysis.* J Bacteriol **169**:981-989.
253. **Trisler, P. and S. Gottesman.** 1984. *lon transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K-12.* J Bacteriol **160**:184-191.
254. **Tu, X., T. Latifi, A. Bougdour, S. Gottesman and E. A. Groisman.** 2006. *The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in Salmonella enterica.* Proc Natl Acad Sci U S A **103**:13503-13508.
255. **Tzeng, Y. L. and J. A. Hoch.** 1997. *Molecular recognition in signal transduction: the interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins revealed by alanine scanning mutagenesis.* J Mol Biol **272**:200-212.
256. **Uzzau, S., N. Figueroa-Bossi, S. Rubino and L. Bossi.** 2001. *Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella.* Proc Natl Acad Sci U S A **98**:15264-15269.
257. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J. O. Lee and M. Y. Popoff.** 1996. *Characterization of the rcsA and rcsB genes from Salmonella typhi: rcsB through tvIA is involved in regulation of Vi antigen synthesis.* J Bacteriol **178**:1691-1698.
258. **Vogel, H. J. and D. M. Bonner.** 1956. *Acetylornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties.* J Biol Chem **218**:97-106.
259. **Wallis, T. S. and E. E. Galyov.** 2000. *Molecular basis of Salmonella-induced enteritis.* Mol Microbiol **36**:997-1005.
260. **Wang, Q., Y. Zhao, M. McClelland and R. M. Harshey.** 2007. *The RcsCDB signaling system and swarming motility in Salmonella enterica serovar Typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes.* J Bacteriol **189**:8447-8457.
261. **Waterman, S. R. and D. W. Holden.** 2003. *Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system.* Cell Microbiol **5**:501-511.
262. **Wehland, M., C. Kiecker, D. L. Coplin, O. Kelm, W. Saenger and F. Bernhard.** 1999. *Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from Erwinia amylovora and Pantoea stewartii subspecies stewartii.* J Biol Chem **274**:3300-3307.
263. **West, A. H. and A. M. Stock.** 2001. *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.* Trends Biochem Sci **26**:369-376.
264. **Wigley, D. B., G. J. Davies, E. J. Dodson, A. Maxwell and G. Dodson.** 1991. *Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein.* Nature **351**:624-629.
265. **Wilmes-Riesenberg, M. R., J. W. Foster and R. Curtiss, 3rd.** 1997. *An altered rpoS allele contributes to the avirulence of Salmonella typhimurium LT2.* Infect Immun **65**:203-210.
266. **Wolfe, A. J.** 2005. *The acetate switch.* Microbiol Mol Biol Rev **69**:12-50.
267. **Wolfe, A. J. and R. C. Stewart.** 1993. *The short form of the CheA protein restores kinase activity and chemotactic ability to kinase-deficient mutants.* Proc Natl Acad Sci U S A **90**:1518-1522.
268. **Wong, K. K., M. McClelland, L. C. Stillwell, E. C. Sisk, S. J. Thurston and J. D. Saffer.** 1998. *Identification and sequence analysis of a 27-*

- kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. Infect Immun* **66**:3365-3371.
269. **Worley, M. J., K. H. Ching and F. Heffron.** 2000. *Salmonella SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. Mol Microbiol* **36**:749-761.
270. **Yamashino, T., C. Ueguchi and T. Mizuno.** 1995. *Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in Escherichia coli: involvement of the nucleoid protein H-NS. EMBO* **14**:594-602.
271. **Yanagihara, S., S. Iyoda, K. Ohnishi, T. Iino and K. Kutsukake.** 1999. *Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of Salmonella typhimurium. Genes Genet Syst* **74**:105-111.
272. **Young, G. M., J. L. Badger and V. L. Miller.** 2000. *Motility is required to initiate host cell invasion by Yersinia enterocolitica. Infect Immun* **68**:4323-4326.
273. **Zapf, J., U. Sen, Madhusudan, J. A. Hoch and K. I. Varughese.** 2000. *A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. Structure* **8**:851-862.
274. **Zehnbauer, B. A., E. C. Foley, G. W. Henderson and A. Markovitz.** 1981. *Identification and purification of the Lon+ (capR+) gene product, a DNA-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:2043-2047.
275. **Zhou, Y. and S. Gottesman.** 2006. *Modes of regulation of RpoS by H-NS. J Bacteriol* **188**:7022-7025.
276. **Zhou, Y., S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi and S. Wickner.** 2001. *The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. Genes Dev* **15**:627-637.
277. **Zhou, Y. N. and C. A. Gross.** 1992. *How a mutation in the gene encoding sigma 70 suppresses the defective heat shock response caused by a mutation in the gene encoding sigma 32. J Bacteriol* **174**:7128-7137.