



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Factores Gre de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, su papel en el control de la fisiología y patogenicidad**

Tania Cristina Gaviria Cantín

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Universitat de Barcelona  
Facultat de Biologia  
Departament de Microbiologia

**Factores Gre de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, su papel en el control de la fisiología y patogenicidad**

Memoria presentada por Tania Cristina Gaviria Cantin para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología

VºBº Director y tutor de la Tesis

Memoria presentada por

Dr. Carlos Balsalobre Parra

Tania Cristina Gaviria Cantin

**Barcelona 2016**



## AGRADECIMIENTOS

De antemano he de confesar que he pospuesto lo que más he podido el momento de escribir los agradecimientos, no porque no tenga deseos de agradecer, sino porque al escribirlos iba a sentir que esta etapa estaba culminando, y sinceramente le tengo un tanto de temor a eso. También porque tengo mucho que agradecer y a muchos a quienes agradecer, espero que no se me escape ninguno.

Primeramente a mi Padre Celestial, sin Él nada de esto habría sido posible. He tenido el privilegio de ver su mano sobrenatural en mi vida, y no solo en los últimos años que he estado lejos de casa, sino desde siempre. Palabras faltan cuando se trata de agradecer por cada milagro, por cada promesa cumplida y su gracia sobre gracia. Por darme la oportunidad de vivir en esta maravillosa ciudad como Barcelona donde los amigos se convierten en familia y a lugares extraños terminas llamándoles hogar. ¡Gracias Dios por tanto!

Me gustaría darle mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonio Juárez, quien me abrió las puertas para entrar a este grupo de investigación. Gracias Antonio por contestar tan rápido mi mail cuando llegué por primera vez a este país donde no conocía a nadie, gracias por atender a esta colombiana desubicada e insistente que en primera instancia vendría a hacer su máster y regresaría a su país al cabo de un año. Hoy han pasado más de 5 años y no puedo estar más que agradecida por convencerme de aplicar para una beca y darme la oportunidad de trabajar en este increíble grupo de investigación.

A Carlos (¡Charlie!), la mente pensante detrás de este trabajo y el mejor jefe del mundo. Me quedo corta cuando se trata de agradecerte Carlos. Sabes que a pesar de mi mal genio y todo lo que eso conlleva, eres la persona que más ha aportado a mi desarrollo profesional en estos 5 años. Y no solo profesional, contigo se aprende mucho más que eso, porque eres una gran persona. Gracias por tu SANTA PACIENCIA, porque reconozco que conmigo no es fácil, y por eso valoro tanto a las personas que se toman en serio este reto. Gracias por las largas reuniones que desde el primer momento dedicaste a explicarme con dibujitos y

colorines los tan complicados, para mí, mecanismos de regulación génica. Gracias por los consejos, que aunque pareciera que me entraban por un oído y me salían por el otro, que sepas que siempre los tuve y los tendré presentes. Gracias por siempre estar disponible ante cualquier duda o inquietud y dedicar tanto tiempo a corregir esta memoria. Por enseñarme que hacer ciencia es sinónimo de honestidad y que grandes sacrificios siempre conllevan a grandes recompensas. Gracias por haber hecho de mi doctorado una incomparable experiencia. Y tranquilo, que nos ha quedado una tesis preciosa☺.

A la Cristina, que aunque no compartimos mucho el trabajo de investigación, siempre estuvo allí ante cualquier duda o necesidad. Gracias Cristina por ayudarme en el tema de las tediosas comandas, por resolver muchas de mis dudas burocráticas, y por las charlas sobre moda, música y las anécdotas de tus hijos. Gracias por los abrazos y las palabras de ánimo, que siempre llegaron en el momento justo. Gracias por ser como esa mamá que tanta falta nos hace a los que estamos lejos de casa.

A la Sonieta. Sonietaaa moltes gràcies per tot! A pesar que ya no estas más con nosotros por estos lares, siempre harás parte de nosotros y serás nuestra mamá pato XD. No podría dejar de agradecer a la persona que me recibió con todo y mi torpeza los primeros días en el lab, cuando llegué a aprender sobre el mundo de la microbiología y parecía que no me hubiesen enseñado nada eso en la uni jaja. Gracias Sonieta por tu paciencia, por enseñarme desde cómo preparar un medio de cultivo, hasta cómo llevar todo un laboratorio de investigación. ¡Eres una crack!

A mi Martliinx. Gracias porque más que mi compañera del lab, eres mi amiga y eso hace que valgan la pena estos años en este país. Que sepas que desde que dejaste el lab nada ha vuelto a ser igual, al menos para mí. Gracias por tu paciencia al ayudarme con los protocolos (sobre todo con el Datsenko =D), con el formato de la tesis (sabes que tengo un 0 en creatividad), entre otras cosas que no necesariamente hacen parte de la vida del lab. Gracias por las largas charlas sobre el "monotema" y demás. Gracias por abrirme las puertas de tu casa en Girona para darlo todo en las flores y las barracas (aunque la última vez no vimos

a Els catarres, no pasa res). En fin, han sido muchos los momentos que hemos compartido y sabes que las puertas de mi casa tanto en Colombia como aquí, siempre estarán abiertas para ti. Recuerda tener hijos pronto por si me regreso a Colombia, pueda conocerlos XD!

A Mario. Gracias Marius por tu carisma y personalidad. Personas como tú siempre merece la pena conocer. Gracias porque aunque fue corto el tiempo compartido contigo en el lab, que sepas que fue suficiente para ganarte mi cariño. Gracias por las charlas tropicales, sobre virus, frutas y demás (a veces me confunden con brasileña jaja) y por estar tan pendiente de mí.

A la Paytu. Pituuuuu de antemano perdón por no bajar tan a menudo a desayunar en los últimos meses, ya sabes que eso de bajar no es lo mío =D. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar con tus fantabulosas ideas como "Senyor". Por las invitaciones a la prospe y al san xibeco (que nunca fui), y a tus presentaciones de "ximi ximi", por las charlas sobre política (que rara vez me enteraba), por ser mi vecina de poyata y enseñarme a respetar la propiedad privada XD. Gracias por hacer que personas como yo se puedan sentir en casa.

Al Yuri. Por sus cursos intensivos de catalán badalonés XD. Por su ayuda con los tediosos microarrays y demás. Gracias Yuri, porque a pesar de nuestras diferencias fuimos hijos del mismo "papi" jeje y eso nos hizo más cercanos. Espero que vaya muy bien con Cashel y heredes todo ese ppGpp que le rodea. Ah y que quede claro, soy del pacífico eh?! XD.

Al Yusi (me va a matar por llamarlo así). Gracias Yusi por tu ayuda en Suecia, cuando el frío era demasiado extremo para esta criatura tropical. Gracias por los consejos e ideas en el lab y por hacer parte de la 3'UTR de *hild*. Espero que termine de ir igual o mejor de como ha ido hasta ahora por el lab para que no tenga que cantarte la canción jaja XD.

A la Carla, que a pesar de nuestras diferencias, compartimos grandes experiencias tanto dentro como fuera del lab. De corazón espero que por Liverpool las cosas estén yendo de maravilla.

A todos los estudiantes que han pasado por el lab. 4: Jana, Guillen, Elsa, Cinthia, Ana..... Gracias por llegar y no hacerme sentir las más joven ;).

A la gente del lab 2. Gracias por las charlas compartidas mientras usaba el Nanodrop. Quisiera agradecer muy especialmente a la Lily: Bru de mi corazón, gracias infinitas por acompañarme estos últimos tres años cuando quedé un tanto huérfana de amistades. Gracias por entrar a mi vida y enseñarme lo que es compartir sin interés, por la paciencia mutua, por tantos momentos alegres (comiendo "patelito", viajando o yendo de compras...) y otros cuantos tristes. Gracias por tomarte la molestia de conocerme más que a nadie en este país y por enseñarme que personas buenas aún existen. Sabes que siempre estaré allí para cuando me necesites y ya sea en Ecuador, Colombia o España, espero que nuestra amistad siga intacta. Aah! Y perdón por abandonarte tanto las últimas semanas mientras escribía esta memoria, ya me entenderás....

A la gente del lab. 3, en especial a Lucía y a Fran, por ayudarme con los cultivos celulares, por las risas y charlas compartidas. Tengo pendiente una visita obligatoria a las canarias y a los sures.

Gracias también a los demás integrantes del departamento de Micro, que ya sea por un saludo en el pasillo, han hecho parte de esta historia de tesis doctoral.

A mis amigos de fuera del lab: Eirini, Maribel, Paloma, Julieth, Eliecer, Jimmy, Luisa... Gracias por estar tan pendientes de mí todos estos años. Por los cafés y las largas charlas sobre el futuro, gracias infinitas por los ánimos en los momentos difíciles. A mis amigos de Hillsong, en especial a Nataly, Janet, Manu, Valentina, Ana, Cinthya... Gracias por dejarse usar por Dios y brindarme una sincera amistad. Por aguantar mis quejas así no las entendieran. Gracias por hacerme sentir como en casa todos estos meses y saber que siempre tenía un refugio al cual recurrir cuando las cosas se ponían duras. Espero que nuestra amistad continúe en aumento y como decimos siempre, a estar expectantes porque "lo mejor aún está por venir".

Por último, quisiera agradecer a mi familia. A mi Papá por invertir y creer en mí incondicionalmente. Gracias "Pa" por apoyarme y sobre todo tener la convicción de que mi carrera serviría para algo. No podría estar más que agradecida por ser tu hija y este nuevo galardón está sin duda dedicado a ti. A mi Mami, gracias por ser la mejor de todas, por tus consejos de vida, por todas las noches en vela orando para que nada me faltara. Sé que estarás más que orgullosa de que tu primogénita al fin sea doctora y ver que todos estos años lejos de casa han valido la pena. A Ángela y a Nando "mi papito", gracias por ser las ayudas idóneas de mis padres. Dios me premió al darme unos segundos padres como ustedes y sé que también están alegres con esta nueva meta. A mis 4 abuelitos, porque aunque sea tan ingrata y casi no los llamo siempre tendré presente que también gracias a ellos estoy donde estoy ahora, por premiarme con los padres que tengo.

A mis hermanos, Daniel y Chelsy, gracias por la alegría que me aportan al saber que los tengo, y a pesar de ser la hermana mayor que siempre ha estado ausente, espero recuperar algún día tanto tiempo lejos. A Jessica, ¡mi nañiiiis! Gracias por tus consejos de "hermana mayor" ya te he dicho que naciste vieja =D, gracias por ayudarme con el diseño de la portada y por aguantar todas mis quejas de los últimos meses. No sé qué haría sin tu apoyo.

A mis tías Olga, Mercedes "mi tiuchis" y Amanda. Gracias tías por ser como otras madres para mí y celebrar conmigo cada etapa. A mis demás tíos y primos, gracias por recibirme con los brazos abiertos cada diciembre que volvía a casa.

Y a ti Barcelona, porque sin darme cuenta te convertiste en mi hogar...





A mi Papá, por su apoyo incondicional

¡Va por ti Pa!

“But by the grace of God I am what I am, and his grace to me was not without effect...”

1 Corinthians 15: 10 (NIV)



## **TABLA DE CONTENIDO**



## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 El género <i>Salmonella</i>	1
1.2 Estructura del genoma de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	5
1.2.1 Isla de patogenicidad 1 (SPI-1)	6
1.2.1.1 Proteínas secretadas por el sistema de secreción de tipo III de la SPI-1	7
1.2.1.2 Regulación de la expresión génica de la SPI-1	10
1.2.2 Isla de patogenicidad 2 (SPI-2)	15
1.2.3 Otras islas de patogenicidad	17
1.2.4 Plásmidos y bacteriófagos	18
1.2.4.1 El plásmido pSLT	18
1.2.4.2 Bacteriófagos	19
1.3 Procesos celulares de <i>Salmonella</i> de especial interés para este estudio	19
1.3.1 Invasión	19
1.3.2 Formación de biofilm	21
1.3.2.1 CsgD regula la formación de biofilm en <i>Salmonella</i>	23
1.3.2.2 Interacción entre CsgD y otros reguladores en la formación de biofilm	24
1.3.3 Papel del flagelo y las fimbrias de tipo 1 en la invasión de <i>Salmonella</i>	26
1.4 ARN polimerasa, enzima que cataliza la transcripción	30
1.4.1 la ARN polimerasa	30
1.4.2 Etapas de la transcripción	31
1.4.3 Factores que interaccionan con el canal secundario de la ARN polimerasa	37
1.4.3.1 ppGpp	38
1.4.3.2 DksA	40
1.5 Factores Gre	41
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos	55
3.2 Medios de cultivo y antibióticos	58
3.2.1 Medios de cultivo	58
3.2.2 Antibióticos	59
3.3 Métodos microbiológicos	59
3.3.1 Esterilización	59
3.3.2 Mantenimiento de microorganismos	60
3.3.3 Inoculación y cultivo de microorganismos	60
3.4 Oligonucleótidos	60
3.5 Técnicas experimentales con ADN	63
3.5.1 Aislamiento de ADN plasmídico	63
3.5.2 Utilización de enzimas de restricción y ligación	63
3.5.3 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
3.5.4 Secuenciación de fragmentos de ADN	65
3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	65
3.5.6 Aislamiento de fragmentos de ADN	66
3.6 Técnicas experimentales con ARN	66
3.6.1 Extracción de ARN total	66
3.6.1.1 Cuantificación del ARN total purificado	67
3.6.2 Microarrays	67
3.6.3 Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	68
3.6.3.1 qPCR utilizando SYBR®GREEN. Condiciones de reacción	68
3.6.3.2 Análisis de los datos obtenidos	70
3.6.4 Ensayos de PCR retrotranscriptasa (RT-PCR)	70
3.7 Métodos de transferencia génica	71
3.7.1 Transformación bacteriana	71
3.7.1.1 Transformación bacteriana de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl <sub>2</sub> (Cohen <i>et al.</i> , 1972)	71
3.7.1.2. Electroporación (Dower <i>et al.</i> , 1988)	72
3.7.2 Transducción generalizada con bacteriófago P22	72

3.7.2.1 Obtención de lisados P22	72
3.7.2.2 Titulación del lisado fágico	73
3.7.2.3 Transducción con P22	73
3.8 Métodos de mutagénesis bacteriana	74
3.8.1 Inactivación de genes cromosómicos por reemplazamiento alélico	74
3.8.1.1 Generación del fragmento de PCR conteniendo un gen de resistencia a antibióticos	74
3.8.1.2 Reemplazamiento alélico	75
3.8.1.3 Eliminación del casete de resistencia al antibiótico	75
3.8.2 Construcción de fusiones génicas con el gen <i>lacZ</i> mediante la recombinasa FLP	76
3.8.3 Construcción de fusiones génicas con la secuencia codificante para 3Flag mediante la recombinasa FLP	77
3.9 Técnicas experimentales con proteínas	78
3.9.1 Precipitación de proteína total secretada	78
3.9.2 Obtención de extractos celulares	78
3.9.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	79
3.9.3.1 Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie	81
3.9.4 inmunodetección de proteínas	81
3.9.5 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa (Miller, 1992)	83
3.10 Ensayos de citotoxicidad mediante determinación de la actividad hemolítica	84
3.11 Ensayos fisiológicos	85
3.11.1 Estudios de formación de biofilm	85
3.11.2 Estudios de motilidad	86
3.11.3 Análisis de resistencia al estrés oxidativo	86
3.11.4 Detección de bacteriófagos	87
3.11.5 Ensayos de invasión sobre células HT-29	87
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>89</b>
4.1 Caracterización de mutantes <i>greA</i> , <i>greB</i> y <i>greAgreB</i> en <i>S. Typhimurium</i> SL1344	91



4.1.1 Obtención de cepas mutantes para <i>greA</i> y <i>greB</i> por reemplazamiento alélico en <i>S. Typhimuriun</i> SL1344 <i>his</i> <sup>+</sup>	91
4.1.2 Regulación de los genes <i>greA</i> y <i>greB</i>	95
4.1.3 Análisis fenotípicos de las cepas mutantes para los factores Gre	102
4.1.3.1 Actividad Hemolítica	102
4.1.3.2 Motilidad	104
4.1.3.3 Resistencia al estrés oxidativo	105
4.2 Papel de los factores Gre en la expresión de los genes presentes en la SPI-1	107
4.2.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en la invasión de células epiteliales	107
4.2.2 Efecto de los factores Gre en el perfil de proteínas secretadas de <i>Salmonella</i> .	110
4.2.3 Regulación de <i>hilA</i> mediada por los factores Gre	114
4.2.4 Efecto de los factores Gre en HilD, HilC y RtsA, reguladores de la expresión de <i>hilA</i>	120
4.2.5 HilD es la diana de la regulación, mediada por los factores Gre, de los genes de la SPI-1	123
4.2.6 Regulación de la SPI-2 mediante los factores Gre a través de HilD	129
4.2.7 Mecanismo de regulación de la expresión de HilD mediado por los factores Gre	131
4.2.8 La actividad antipausa de la transcripción de los factores Gre es necesaria para la expresión de <i>hilD</i>	140
4.3 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en <i>Salmonella</i>	144
4.3.1 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en <i>Salmonella</i> SV5015	144

4.3.2 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en <i>Salmonella</i> UMR1	146
4.3.2.1 Papel de los factores Gre en la expresión transcripcional del gen <i>csgD</i>	150
4.4 Efecto de los factores Gre en la expresión génica de <i>Salmonella</i> . Análisis Transcriptómico	157
4.4.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en el patrón global de expresión de <i>Salmonella</i>	158
4.4.1.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en el patrón de expresión del <i>core genome</i> y genes transferidos horizontalmente en <i>Salmonella</i>	163
4.4.2 Genes expresados diferencialmente en la cepa doble mutante <i>greAgreB</i> respecto a la cepa salvaje	167
4.4.2.1 Efecto de los factores Gre en la expresión del <i>core genome</i> de <i>Salmonella</i>	170
4.4.2.2 Efecto de los factores Gre en la expresión de los genes transferidos horizontalmente en <i>Salmonella</i>	175
4.4.3 Genes corregulados por los factores Gre y la proteína DksA en <i>Salmonella</i>	182
<b>5. DISCUSIÓN</b>	193
<b>6. CONCLUSIONES</b>	211
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	215
<b>8. ANEXOS</b>	249



# 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El género *Salmonella*

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está compuesto por bacterias Gram-negativas, no esporuladas, en forma de bacilo. Estos microorganismos tienen un diámetro de 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$ , con una longitud de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , son aerobios facultativos y son motiles mediante flagelación peritrica (Murray *et al.*, 1999) (Coburn *et al.*, 2007). Dentro de sus características bioquímicas, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otros hidratos de carbono, son oxidasa negativos y mayoritariamente catalasa positivos. Reducen nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen  $\text{H}_2\text{S}$ , son ureasas negativos, no desaminan fenilalanina, y son tetrionato reductasas (Linder, 1995).

El género *Salmonella* se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Tindall *et al.*, 2005). En la subespecie *enterica* se encuentran la mayoría de los serovares causantes de enfermedades en humanos y animales domésticos (Tindall *et al.*, 2005) (Grimont & Weill, 2007). El nombre del serovar se escribe en letra regular y la primera letra en mayúscula, por ejemplo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). Los serovares pertenecientes a las otras subespecies son asignados por su fórmula antigénica basada en el esquema White-Kauffmann-Le Minor, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi (K), después del nombre de la subespecie. El esquema White-Kauffmann-Le Minor es definido por The World Health Organization (WHO) en colaboración con el centro de referencia e investigación en *Salmonella* del Instituto Pasteur.

*Salmonella* tiene importante relevancia a nivel de salud pública ya que es uno de los principales patógenos entéricos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Las dos patologías más comunes causadas por *Salmonella* son la

fiebre tifoidea y la salmonelosis. La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica causada exclusivamente por *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi A y B, que tienen como único hospedador conocido el humano. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, dolor abdominal y diarrea. La infección puede producir fallo respiratorio, hepático y daño neurológico (Parry *et al.*, 2002). La salmonelosis es causada por toda una serie de serovares no tifoideos, siendo los más relevantes Typhimurium y Enteritidis, que también pueden infectar un amplio rango de animales. La salmonelosis es una enteritis generalmente autolimitante cuyos síntomas son diarrea, fiebre, vómito y dolor abdominal (Ohl & Miller, 2001) (Gordon, 2008).

El informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre enfermedades transmitidas por alimentos, señala que en 2013, un total de 82694 casos confirmados de salmonelosis fueron notificados por 27 estados miembros de la Unión Europea (UE), dando como resultado una incidencia de 20,4 casos por 100000 habitantes. Esto representa un 7,9 % de disminución respecto al 2012. Como en años anteriores, los dos serovares de *Salmonella* más comúnmente detectados en 2013 fueron Enteritidis y Typhimurium, representando un 39,5 % y 20,2 %, respectivamente, de todos los serovares detectados en humanos. En los casos de gastroenteritis notificados en España, *Salmonella* se posiciona en segundo lugar, después de *Campylobacter*, con 4537 casos. *S. Typhimurium* fue el serovar declarado con más frecuencia con 1218 casos y le sigue en frecuencia *S. Enteritidis* con 1024 casos.

Al ser *Salmonella* transmitida comúnmente a través de alimentos contaminados, la EFSA también reporta las prevalencias de los diferentes serovares de *Salmonella* en diferentes animales de consumo humano. En 2013, el serovar aislado con mayor frecuencia en aves de corral (*Gallus gallus*) fue *S. Infantis*; en carne de pollo los más frecuentes fueron *S. Infantis* y *S. Enteritidis*, mientras que en carne de pavo uno de los más frecuentes fue *S. Typhimurium*. Éste último también fue el más frecuente en ganado y carne bovina, cerdos y carne de cerdo seguido de *S. Derby* y variantes monofásicas de *S. Typhimurium*.

El organismo modelo de estudio de esta tesis es *S. Typhimurium*. En humanos causa salmonelosis, gastroenteritis caracterizada por diarrea inflamatoria, originada normalmente tras la ingestión de alimentos o agua contaminados. Para causar infección, *Salmonella* debe superar y manipular las barreras defensivas del organismo hospedador en sitios específicos a lo largo del curso de la infección. Una vez ingerida, la bacteria debe resistir al ambiente ácido estomacal y posteriormente colonizar la zona distal del intestino delgado. *Salmonella* debe atravesar el moco intestinal antes de adherirse a las células epiteliales. Dependiendo del serovar, *Salmonella* puede expresar un amplio rango de factores de adhesión, tales como Fim (fimbria de tipo 1), Lpf (*long polar fimbria*) o Tafi (*thin aggregative fimbriae*) (Wagner & Hensel, 2011). La adhesina de la fimbria de tipo 1, FimH, media la unión a células epiteliales y ayuda a inducir la captación dependiente de actina en células dendríticas de ratones y en células HeLa, indicando que también puede promover invasión (Guo *et al.*, 2007) (Lara-Tejero & Galán, 2009). El paso de la bacteria a través de la pared intestinal se cree que es por transcitosis, que se define como la invasión de enterocitos o células M en el lado apical, migración al lado basolateral y la exocitosis dentro del espacio intersticial de la lámina propia (Müller *et al.*, 2012). En la lámina propia, el escenario puede variar dependiendo del serovar de *Salmonella* y del hospedador. En humanos, *S. Typhimurium* induce la producción de citoquinas y la migración de neutrófilos a través del epitelio intestinal causando diarrea intestinal (Wallis & Galyov, 2000). Más detalles del proceso de invasión se explican en el apartado 1.3.1.

## 1.2 Estructura del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

*S. Typhimurium* contiene un cromosoma de 4857 kilobases (kb) y el plásmido de virulencia pSLT de 94 kb (McClelland *et al.*, 2001). La cepa SL1344 utilizada ampliamente en este estudio, también contiene los plásmidos pCol1B9 (Kröger *et al.*, 2012) y pRSF1010 (Kröger *et al.*, 2012) (Sherburne *et al.*, 2000). *Salmonella* contiene profagos funcionales: Gifsy 1 y 2, conocidos por jugar un papel durante la invasión celular; Fels-1 y 2, SopEΦ, entre otros (Stender *et al.*, 2000).

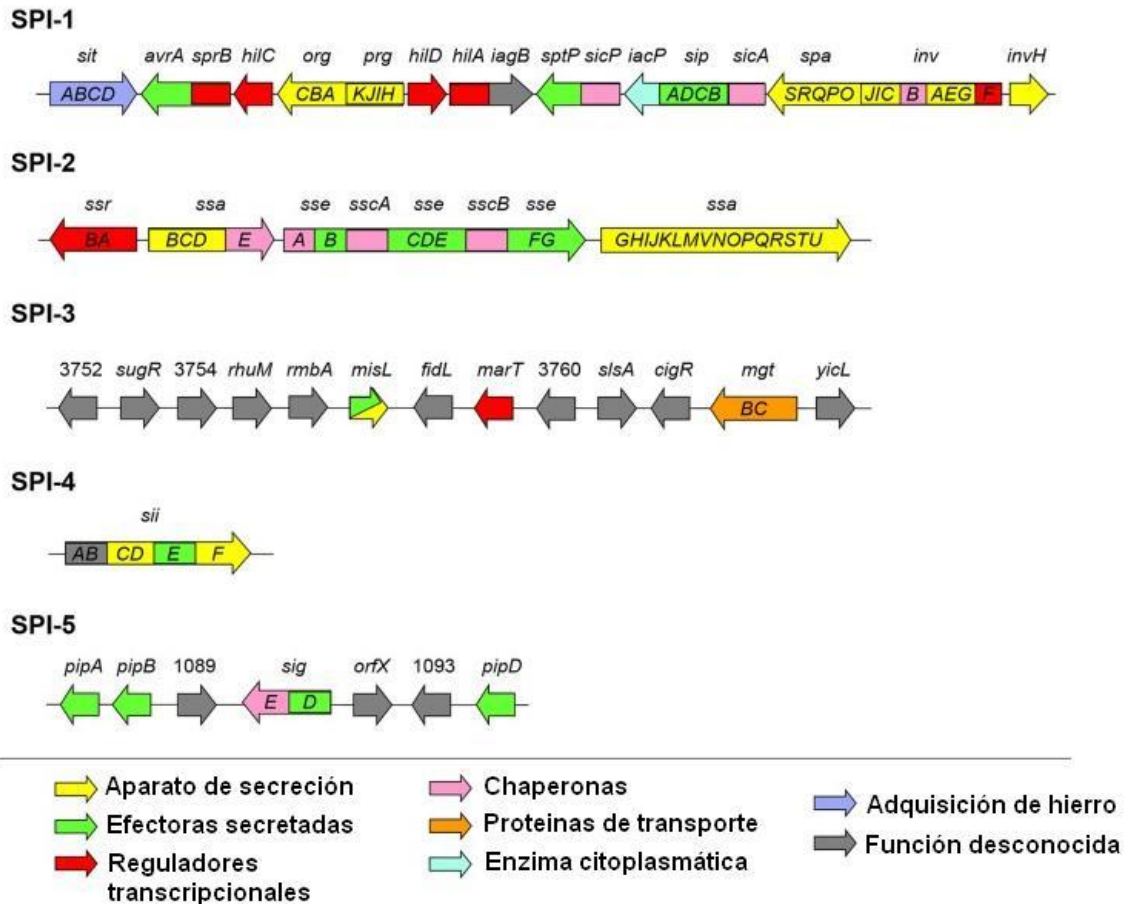


En el genoma de *S. Typhimurium* hay un elevado número de genes que codifican para factores de virulencia necesarios durante el proceso infectivo. Estos genes de virulencia están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI, del inglés *Salmonella pathogenicity island*). Un total de cinco SPI han sido identificadas que han sido presumiblemente adquiridas a lo largo de diferentes procesos evolutivos por medio de la transferencia horizontal de genes (HTG, del inglés *horizontal transfer genes*), y su presencia se ha estabilizado en el genoma gracias a la adaptación de mecanismos de regulación de la expresión génica (Schmidt & Hensel, 2004). Estas SPI se caracterizan porque su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano (53 %), presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en el loci de ARNt (ARN de transferencia) (Blanc-Potard *et al.*, 1999) (Marcus *et al.*, 2000) (McClelland *et al.*, 2004). Además, también se encuentran genes de virulencia en otras localizaciones concretas del cromosoma, como profagos y el plásmido pSLT.

### 1.2.1 Isla de patogenicidad 1 (SPI-1)

La SPI-1 es la mejor caracterizada de las cinco islas. Presenta aproximadamente 40 kb y está localizada en el centisoma 63 del cromosoma de *S. Typhimurium*. Esta isla está flanqueada por *fhIA* y *mutS*, tiene un 42 % de G-C y no se encuentra asociada a un gen ARNt (Collazo & Galán, 1997). Contiene 31 genes que codifican para varios componentes de un sistema de secreción tipo III (T3SS, del inglés *type three secretion system*), proteínas reguladoras del T3SS y proteínas efectoras (Figura 1.1) (Collazo & Galán, 1997). El fenotipo de virulencia asociado a esta isla depende de la capacidad del T3SS para secretar proteínas efectoras, codificadas tanto dentro como fuera de la SPI-1. Una vez en el citoplasma de la célula hospedadora, estas proteínas efectoras desencadenan el proceso de invasión de *Salmonella* en células no fagocíticas, por medio de la reordenación del citoesqueleto de actina (Marcus *et al.*, 2000). El translocón del T3SS, una estructura en forma de poro, se incrusta en la membrana de la célula

hospedadora y permite así que las proteínas efectoras sean liberadas al citoplasma (Lostroh & Lee, 2001) (Ellermeier & Slauch, 2007).



**Figura 1.1** Representación esquemática de los genes de las cinco islas de patogenicidad (SPIs) y su función putativa. Modificado de (Fàbrega & Vila, 2013).

### 1.2.1.1 Proteínas secretadas por el sistema de secreción de tipo III de la SPI-1

*Salmonella* presenta dos T3SS, el codificado en la SPI-1 y otro codificado en la SPI-2. Ambos se caracterizan por: 1) las proteínas secretadas no presentan secuencia señal amino-terminal, 2) varias de las proteínas efectoras requieren de chaperonas específicas para su secreción, 3) para la activación del sistema se requiere de una señal inductora, que generalmente es el contacto con la célula del hospedador, permitiendo la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora (Blanc-Potard *et al.*, 1999). El

reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedadora inducido por las proteínas efectoras, tiene como fin último internalizar la bacteria, la cual se mantiene dentro de las SCV (del inglés *Salmonella-containing vacuoles*). Las bacterias son capaces de sobrevivir dentro de las células y pueden llegar a los tejidos más profundos, donde inducen una potente respuesta inflamatoria.

Se han reconocido sistemas homólogos en otras bacterias patógenas: *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), entre otras. Es importante mencionar que varios componentes del T3SS son similares a las proteínas Fli/Flh involucradas en la biosíntesis del flagelo (apartado 1.3.3). Se han identificado al menos 13 proteínas cuya secreción es mediada por el T3SS de la SPI-1 (T3SS-1): AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SptP y SspH, cada una con una función específica aunque se ha detectado redundancia funcional entre algunas de ellas (Galán, 1996). En general, la principal función de estos efectores es inducir el ondulamiento de la membrana de la célula hospedadora, resultando en la entrada de la bacteria. Un resumen de la función de cada una de las proteínas secretadas a través del T3SS-1 se encuentra en la tabla 1.1. A continuación se describe con mayor detalle las proteínas SipA, SipC, SopE y SopE2, que son claves en la invasión y han sido objeto de estudio en este trabajo.

### **-SipA y SipC**

Las proteínas efectoras SipA y SipC, *Salmonella invasion protein*, ejercen un papel importante durante la invasión de *Salmonella*, proceso que se detalla en el apartado 1.3.1. Estas proteínas se unen a la actina y promueven su polimerización, facilitando la reordenación del citoesqueleto y, en definitiva, el proceso de invasión (Hayward & Koronakis, 1999) (McGhie *et al.*, 2004) (Wall *et al.*, 2007) (Myeni & Zhou, 2010). SipA contiene dos dominios funcionales: la región N-terminal que interviene en el transporte a través del T3SS-1 y el dominio C-terminal o “*actin binding*” que se encarga del ensamblaje de la actina F (Schlumberger *et al.*, 2007). Estudios estructurales indican que SipA actúa como una “grapa molecular” usando sus dos dominios en forma de brazos para atar

los monómeros de actina en hebras de filamentos adyacentes (Lilic *et al.*, 2003). Además se ha demostrado que protege a los filamentos de actina de la fragmentación inducida por la proteína Gelsolina y puede reincorporar los filamentos rotos por dicha proteína (McGhie *et al.*, 2001). SipC también está involucrada en la agrupación así como en la nucleación de la actina, gracias a sus dos dominios N y C terminales, que cumplen con las dos funciones respectivamente (Hayward & Koronakis, 1999) (McGhie *et al.*, 2009) (Myeni & Zhou, 2010). También se ha demostrado que SipC podría estar modulando el ensamblaje y/o función del translocón (Hayward & Koronakis, 1999). Así, la actividad combinada de SipA y SipC promueve la formación de filamentos de actina cerca de las bacterias adheridas, y estabilizan estos filamentos contra los mecanismos de inhibición de las proteínas de la célula hospedadora (Zhou *et al.*, 1999).

### -SopE y SopE2

SopE, codificada en el fago críptico SopEΦ, está presente únicamente en algunas cepas de *S. Typhimurium* como SL1344 (Hardt *et al.*, 1998). SopE2 que muestra una identidad del 69 % con SopE, es codificada por el gen *sopE2* conservado y presente en cepas patógenas de *Salmonella* (Bakshi *et al.*, 2000). Ambas son proteínas efectoras secretadas vía T3SS-1 y también intervienen en la invasión celular, alterando la acción de proteínas de la célula hospedadora, como la actina, involucradas en la organización del citoesqueleto.

**Tabla 1.1** Proteínas secretadas a través del T3SS-1

Proteína	Función	Referencia
AvrA	Inhibe la apoptosis en células epiteliales y la piroptosis en macrófagos.	(Jones <i>et al.</i> , 2008) (Wu <i>et al.</i> , 2012)
SipA	Media la invasión de células epiteliales induciendo la polimerización de actina.	(Zhou <i>et al.</i> , 1999) (Lilic <i>et al.</i> , 2003)
SipB	Media la adhesión a las células epiteliales, piroptosis temprana de macrófagos y autofagia de macrófagos.	(Lara-Tejero & Galán, 2009) (Santos <i>et al.</i> , 2001)

## Introducción

SipC	Media la adhesión a las células epiteliales, la agrupación y nucleación de la actina.	(Lara-Tejero & Galán, 2009) (Myeni & Zhou, 2010)
SipD	Media la adhesión a las células epiteliales.	(Lara-Tejero & Galán, 2009) (Gong <i>et al.</i> , 2010)
SptP	Activadora de GTPasas (Rac y Cdc42) y tirosin fosfatasa.	(Fu & Galán, 1999) (Kaniga <i>et al.</i> , 1996) (Stebbins & Galán, 2000)
SopA	Estimula la transmigración de leucocitos polimorfonucleares.	(Wood <i>et al.</i> , 2000)
SopB/SigD	Induce la respuesta proinflamatoria. Media el reordenamiento del citoesqueleto de actina, la invasión de las células epiteliales y la formación SCV.	(Norris <i>et al.</i> , 1998) (Patel & Galan, 2006) (Hernandez <i>et al.</i> , 2004)
SopD	Promueve la acumulación de fluidos en la infección intestinal.	(Jones <i>et al.</i> , 1998)
SopE y SopE2	Median la invasión promoviendo el ondulamiento de la membrana y el reordenamiento del citoesqueleto de actina.	(Hardt <i>et al.</i> , 1998) (Boyle <i>et al.</i> , 2006)
SlrP	Necesaria en la virulencia de ratones.	(Tsolis <i>et al.</i> , 1999)
SspH1	Necesaria en la virulencia de vacas.	(Miao <i>et al.</i> , 1999)

### 1.2.1.2 Regulación de la expresión génica de la SPI-1

La regulación específica de la expresión de los genes de la SPI-1 está mediada por HilA (*hyperinvasion locus*), regulador transcripcional de la familia de los activadores transcripcionales OmpR/ToxR (Lee *et al.*, 1992). El gen responsable de su síntesis, *hilA*, está codificado en la SPI-1. HilA activa la expresión de los genes que codifican para la síntesis de un T3SS funcional. Regula de manera directa la expresión de la maquinaria de secreción y varias proteínas efectoras al unirse directamente a los promotores de los operones *prg/org* e *inv/spa*. Además, HilA indirectamente controla la expresión de otras proteínas efectoras al inducir la expresión de *invF*, activador transcripcional de la familia AraC, que junto con su chaperona SicA induce la expresión de genes presentes tanto en la SPI-1 (operones *sic/sip*), como fuera de SPI-1 (*sopE* y *sigD*) (Darwin & Miller, 2000) (Darwin & Miller, 2001). El papel de HilA en la regulación de la invasión es

importante, como se evidencia por el hecho de que una delección de *hilA* muestra un fenotipo equivalente a eliminar toda la SPI-1 (Ellermeier *et al.*, 2005). HilA también activa la expresión de genes codificados en otras islas de patogenicidad. Como es el caso del operón *sii* (SPI-4) y el gen *sigD* (SPI-5). Esta activación del gen *sii*, por unión directa de HilA al promotor de *siiA*, promueve la adherencia a las células epiteliales. (Gerlach *et al.*, 2007) (Main-Hester *et al.*, 2008) (Thijs *et al.*, 2007). HilA también interactúa directamente con el promotor del gen *sigD* (efector de T3SS-1) para coordinar su expresión bajo condiciones de inducción de los genes de la SPI-1 (Knodler *et al.*, 2002) (Thijs *et al.*, 2007). Por otro lado, bajo condiciones que inducen la invasión, HilA reprime la expresión de los genes de la SPI-2 como *ssaH* y *sseL*.

La expresión de *hilA* está negativamente autorregulada y está controlada por la acción combinada de tres activadores transcripcionales de la familia AraC: HilC, HilD y RtsA (Schechter & Lee, 2001) (Ellermeier & Slauch, 2003). La homología más importante entre estas proteínas está en su dominio C- terminal, el cual contiene un dominio de unión al ADN. En esta región, RtsA tiene un 56 % de identidad y 76 % de similitud con HilC; 60 % de identidad y 75 % de similitud con HilD; por su parte, HilC presenta una identidad del 58 % y 72 % de similitud con HilD (Ellermeier & Slauch, 2003). Los genes que codifican para HilC y HilD se encuentran en la SPI-1, mientras que RtsA está codificada fuera de la SPI-1 en un fragmento de 15 kb localizado cerca al gen que codifica para el ARN de transferencia, ARNt<sup>PheU</sup>. Estudios previos han demostrado que HilC, HilD y RtsA pueden cada uno unirse al promotor de *hilA*, y que delecciones en los genes *hilC*, *hilD* o *rtsA* causan una disminución en la expresión de *hilA* (Ellermeier *et al.*, 2005). Cada uno de estos reguladores es capaz de autorregularse e inducir la expresión de los otros reguladores de manera independiente formando un bucle positivo de regulación para el control de la expresión de los genes de la SPI-1 (Ellermeier *et al.*, 2005). En el modelo propuesto por Ellermeier y Slauch (2007), HilD es el activador más importante de HilA, encabezando la jerarquía de reguladores y activando la transcripción de HilC y RtsA (Figura 1.2). La acción combinada de los tres activadores puede amplificar la señal y actuar como un “interruptor” de la transcripción de *hilA* (Ellermeier & Slauch, 2007).

Alternativamente, los tres reguladores pueden activar la expresión de *invF* de manera HilA-independiente a través de la interacción directa con un promotor alternativo de *invF* (Ellermeier & Slauch, 2003) (Akbar *et al.*, 2003). Se cree que estos mecanismos conjuntos e independientes del control de ambas proteínas, HilA e InvF, podría aumentar la producción de proteínas específicas, como las efectoras, necesarias en grandes cantidades mientras que mantienen baja la expresión de otros componentes del T3SS-1 (Altier, 2005).

HilD y HilC ejercen un papel importante en la regulación de la transcripción de *hilA* en respuesta a diferentes condiciones medio ambientales incluyendo oxígeno, osmolaridad y pH. Por ejemplo, cuando *S. Typhimurium* crece en condiciones de baja oxigenación y alta osmolaridad, HilD es esencial para la expresión de *hilA*, mientras que la pérdida de *hilC* tiene solo un pequeño efecto sobre la transcripción de *hilA* (Eichelberg *et al.*, 1999) (Rakeman *et al.*, 1999) (Lucas & Lee, 2001). Por su parte, RtsA se une directamente al promotor de *hilA* independientemente de HilC y HilD. Una mutación en el gen *rtsA* es similar a una mutación en el gen *hilC*, disminuyendo la expresión de *hilA* aproximadamente dos veces (Ellermeier & Slauch, 2003).

Ha existido controversia en relación al papel de HilD y HilC en la regulación transcripcional de *hilA*. Inicialmente, análisis del promotor de *hilA* habían mostrado que en la región -314/-68 se unían proteínas represoras, como RcsB o proteínas asociadas al nucleóide como H-NS o Hha, que prevenían que la ARN polimerasa se uniera al promotor de *hilA*. Se demostró también que las proteínas HilD y HilC se unían directamente a la URS (del inglés *upstream regulatory sequences*) del promotor de *hilA*, desplazando o cointeraccionando con las proteínas represoras, para desreprimir *hilA*. Así HilD y HilC fueron consideradas desrepresoras y no activadoras de la expresión de *hilA* (Schechter *et al.*, 1999) (Lucas & Lee, 2001) (Schechter & Lee, 2001). Sin embargo, este modelo contrastaba con la función principal de los reguladores de la familia AraC/XylS que es la interacción con la ARN polimerasa para activar la transcripción (Schechter *et al.*, 1999). Por ello, Boddicker *et al.*, (2003) examinaron el modelo de desrepresión por parte de HilD, analizando el efecto de mutaciones en

reguladores negativos de la expresión de *hilA* como *hha*, *hilE*, *pag* y *ams*, en presencia y ausencia de HilD. Encontraron que en cada combinación de mutantes para los genes represores de *hilA*, la expresión de *hilA* era muy baja en ausencia de HilD. Con esto se concluyó que HilD estaba activando directamente la expresión de *hilA* uniéndose aguas arriba de su promotor.

HilD y HilC presentan un dominio de unión al ADN y un dominio activador de la transcripción muy similares. *In vitro*, HilD y HilC se unen a las mismas regiones localizadas aguas arriba del promotor *hilA* (Schechter & Lee, 2001). El motivo de unión al ADN de HilD, presenta una forma de “*helix-turn-helix*” en el extremo C-terminal dentro de un dominio conservado de 99 aminoácidos característico de los miembros de la familia AraC/XylS (Schechter *et al.*, 1999). Los genes diana de HilD son *hilD*, *hilA*, *hilC*, *rtsA*, *invF*, genes *inv-spa* y *sic-sip*, *invR*, *dsbA*, *slrP* de la SPI-1, *ssrAB* de la SPI-2 y genes de la SPI-4 (Ellermeier & Slauch, 2007) (Main-Hester *et al.*, 2008). En un estudio reciente de Petrone *et al.*, (2014), donde describen los sitios de unión de HilD a lo largo del genoma de *S. Typhimurium* usando la técnica del ChIP-seq (del inglés *chromatin immunoprecipitation-sequencing*), se identificaron 17 regiones de unión de HilD. De estas, 6 ya habían sido descritas, 4 en la SPI-1 (*hilC*, *hilD*, *hilA* e *invF/invR*) y 2 fuera de ella (*siiA* y *rtsA*). De las 11 nuevas dianas descritas, 9 de ellas están localizadas fuera de la SPI1. Esto da una idea del importante *cross talk* que existe entre la SPI-1 y genes localizados fuera de ella.

El mecanismo por el cual RtsA se une al ADN para la regulación de *hilA*, aún no se conoce. RtsA puede activar, de manera independiente a HilA e InvF, el gen *dsbA* que codifica para una isomerasa de enlaces disulfuros. La proteína DsbA se encuentra en el periplasma y es necesaria para la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora, ya que su ausencia bloquea los T3SS-1 y 2 de *S. Typhimurium* (Miki *et al.*, 2004b) (Lin *et al.*, 2008).

A parte de los 3 activadores de la expresión de *hilA*, HilD, HilC y RtsA, existen otros factores que están implicados en la regulación de la expresión de los genes

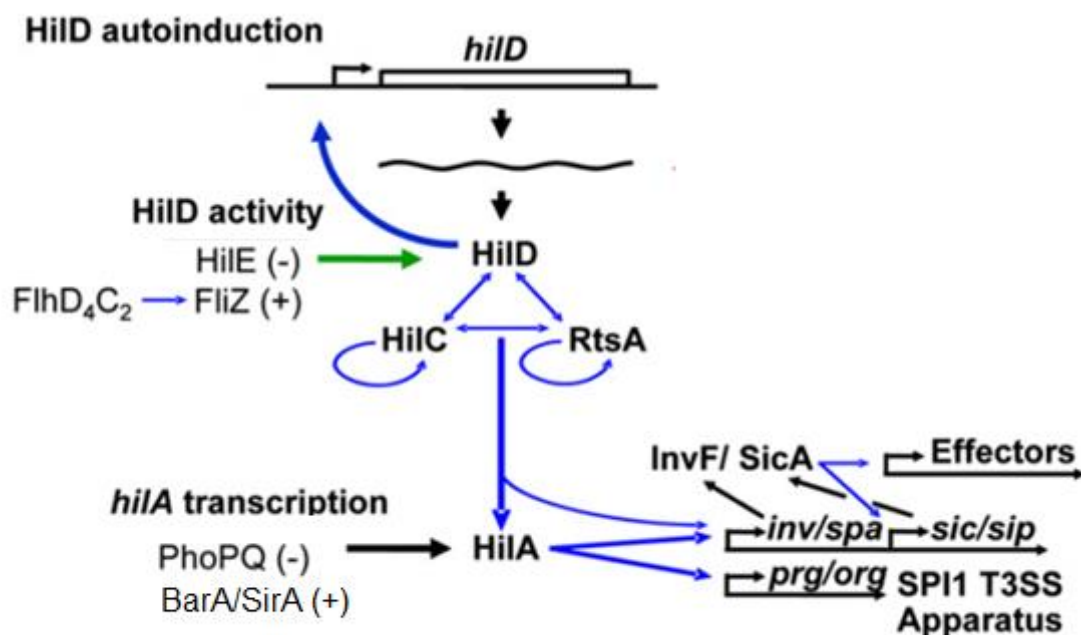


de la SPI-1. HilE es un regulador negativo de la proteína HilD, convirtiéndose en el regulador negativo más importante de la expresión de *hilA*. HilE interacciona de forma directa con HilD impidiendo la subsecuente activación de la expresión de *hilA* (Baxter *et al.*, 2003). El gen *hilE* no está codificado dentro de la SPI-1 sino en el centisoma 98, una región del cromosoma que presenta muchas características propias de una isla de patogenicidad. Una mutación en *hilE* lleva a un incremento en la expresión de *hilA* junto con un incremento en la invasión de *Salmonella* en condiciones de baja oxigenación (Boddicker *et al.*, 2003). La sobreexpresión de HilE reprime de manera importante la transcripción de *invF*, pero de manera independiente de *hilA* (Baxter *et al.*, 2003).

Se ha establecido una correlación entre la expresión de FliZ y los reguladores de la SPI-1. FliZ afecta post-traduccionamente al activador FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, regulador positivo de la expresión del flagelo. De esta manera, FliZ aumenta indirectamente la expresión de los genes flagelares de clase 2 que codifican para las proteínas del ensamblaje flagelar (Wada *et al.*, 2011). Se ha descrito que FliZ afecta HilD de manera positiva (Chubiz *et al.*, 2010). La sobreexpresión de FliZ incrementa la transcripción de *hilA* y se ha sugerido que FliZ activa la expresión de *hilA* por medio de un control post-transcripcional de HilD (Chubiz *et al.*, 2010). En el apartado 1.3.3 se explica en más detalle la implicación del flagelo en la patogenicidad de *Salmonella*.

El sistema de dos componentes, BarA/SirA, codificado fuera de la SPI-1, también regula la expresión de *hilA*. BarA/SirA regula la expresión de numerosos genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, motilidad, formación de biofilm e invasión (Lawhon *et al.*, 2003). Ellermeier *et al.*, (2005) demostraron que la sobreproducción de SirA puede inducir la expresión de una fusión transcripcional *hilA-lac* sólo cuando HilD está presente. Deleciones en *hilC* y *rtsA* no afectan la inducción de la expresión de *hilA* por SirA. Otro sistema de dos componentes implicado en el control de la expresión de *hilA* es el codificado por el locus *phoPQ* que se ha demostrado que actúa a través de HilE para regular negativamente la expresión de los genes de la SPI-1 (Baxter & Jones, 2015). PhoQ, es un sensor quinasa, que fosforila el activador transcripcional PhoP en respuesta a bajos

niveles de cationes extracelulares (García-Véscovi *et al.*, 1996). Dentro del fagosoma del macrófago, donde la concentración de cationes divalentes es baja, PhoP fosforilado activa la expresión de varios genes necesarios para la supervivencia dentro del macrófago (Groisman, 1998). Una mutación *pho-24*, que causa una constitutiva fosforilación de PhoP, reduce significativamente la expresión de *hilA*, sugiriendo que PhoP~P reprime la expresión de *hilA* (Bajaj *et al.*, 1996).



**Figura 1.2** Modelo de la regulación de la SPI-1. Las líneas azules indican la regulación transcripcional y la línea verde representa la regulación post-traduccional. También se indican el efecto de cada regulador ya sea positivo (+) o negativo (-) sobre la expresión de *hilA*. Modificado de (Golubeva *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Isla de patogenicidad 2 (SPI-2)

La SPI-2 también contiene unas 40 kb y está insertada al lado de *va/V*, gen que codifica el ARN<sup>t<sup>Val</sup></sup>. Esta isla está dividida en dos segmentos, los cuales se obtuvieron en diferentes eventos de transferencia horizontal: la porción más pequeña de 14,5 kb y contenido de G-C de 54 %, contiene el operón *ttRSBCA* involucrado en la reducción del tetrato y siete pautas de lectura abierta (ORF

del inglés *open reading frame*) con función desconocida presentes también en la especie *S. bongori* y que al parecer no intervienen significativamente en la infección (Hensel *et al.*, 1999). Este segmento de función no relacionada con virulencia no se muestra en la figura 1.1. La porción mayor de 25,3 kb con un contenido de G-C del 43 %, está presente únicamente en *S. entérica*, alberga genes importantes para la supervivencia y replicación dentro de la célula hospedadora, tanto en células epiteliales como en macrófagos, al encontrarse en el interior de las SCV. Entre los genes presentes se encuentra un segundo T3SS (T3SS-2). Se ha descrito que mutantes carentes de SPI-2, muestran dificultad para invadir cultivos de células epiteliales o macrófagos (Deiwick *et al.*, 1998).

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir de la siguiente manera (Figura 1.1):

- *ssa* (*secretion system apparatus*): representados por *ssaB-E* y *ssaG-V*, cuyos productos conforman el T3SS-2 (Hensel *et al.*, 1997) (Hensel *et al.*, 1998).

- *ssc* (*secretion system chaperone*): codifican las proteínas SscA y SscB (Klein & Jones, 2001).

- *sse* (*secretion system effector*), representados por los genes *sseA-sseG*. (Klein & Jones, 2001).

- *ssr/spiR* (*secretion system regulator*): constituidos por *ssrA* y *ssrB*, que codifican para un sistema regulador de dos componentes, requerido para la expresión de los genes *sse*, *ssa* y *ssc*. SsrB es la proteína reguladora. SsrA, también conocida como SpiR, es la proteína integral de membrana con dos dominios transmembrana los cuales definen una amplia región periplasmática involucrada en detectar señales desconocidas hasta el momento (Fass & Groisman, 2009). SsrB se une a los promotores que controlan la expresión de los genes pertenecientes a la SPI-2, desencadenando la correcta expresión de la maquinaria del T3SS-2 y las proteínas efectoras de esta isla (Walthers *et al.*,

2007) (Worley *et al.*, 2000). El gen *ssrA* está a su vez regulado por OmpR/ EnvZ, que es responsable de la activación y represión de genes en respuesta a cambios de osmolaridad y pH (Beuzón *et al.*, 2001) (Hensel *et al.*, 1998) (Lee *et al.*, 2000).

Interesantemente, HilD es necesaria para la expresión de *ssrAB*. Bustamante *et al.*, (2008) demostraron que la proteína H-NS (*histone-like nucleoid-structuring*) reprime directamente la expresión del operón *ssrAB* y que HilD es necesaria para la desrepresión de dicho operón en presencia de H-NS. En un reciente estudio, Martínez *et al.*, (2014) determinaron que H-NS reprime la expresión de *ssrAB* uniéndose a la región -55/+287, la cual presenta un alto porcentaje de A-T (69,3 %) típico de las regiones donde se une H-NS. También demostraron que en la región -55/+240 es donde HilD co-interacciona con HNS desplazándola y previniendo así la represión que esta ejerce sobre el operón *ssrAB*.

### 1.2.3 Otras islas de patogenicidad

Como ya se comentó, existen hasta 5 SPIs diferentes, si bien, las dos primeras son las más estudiadas.

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitantes de  $Mg^{+2}$ . Su tamaño es de 17 kb y tiene un porcentaje de G-C del 39,8-49,3 %, está localizada en el centisoma 82 inmediatamente adyacente al gen ARNt *seI/C*. Está transcripcionalmente controlada por PhoP/PhoQ. Alberga 10 ORFs organizados en 6 unidades transcripcionales, incluye al operón *mgtCB* que codifica la proteína MgtC (*intramacrophage survival protein*) y el transportador de  $Mg^{+2}$  de alta afinidad MgtB (Blanc-Potard *et al.*, 1999) (Marcus *et al.*, 2000).

Poco se conoce acerca de las SPI-4 y SPI-5. La SPI-4 tiene 27 kb y se encuentra adyacente al gen *ssb*. Está compuesta por 18 genes localizados en el centisoma 92. Codifica un supuesto sistema de secreción tipo I que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente

intracelular en los macrófagos. Contiene un operón llamado *siiABCDEF* que presumiblemente interviene en la interacción inicial con el epitelio intestinal (Gerlach *et al.*, 2007) (Morgan *et al.*, 2004). La SPI-5 tiene un tamaño de 7.5 kb y se encuentra localizada en el gen ARNt *serT*, centisoma 20; su porcentaje de G-C es de 43.6 %. Codifica proteínas efectoras como SopB (SigD) involucradas en la inducción de la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal y en la secreción de fluidos. Para la secreción de las proteínas efectoras, la SPI-5 utiliza el T3SS de la SPI-1 (DeVinney *et al.*, 2000). Otras proteínas codificadas en esta isla son: MarT con secuencia similar a ToxR, una proteína reguladora de *Vibrio cholerae*, y PipA que es secretada y translocada vía T3SS de la SPI-2 (Wood *et al.*, 1998). *sopB*, *pipC*, *pipB* y *pipA*, están dentro de la misma unidad transcripcional cuya expresión está regulada por SsrA/B (Beuzón *et al.*, 2001) (Cotter & DiRita, 2000).

### 1.2.4 Plásmidos y bacteriófagos

#### 1.2.4.1 El plásmido pSLT

pSLT es un plásmido presente exclusivamente en *S. Typhimurium* con un tamaño de 94 kb. pSLT presenta una región de 8 kb, *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), altamente conservada respecto a otros serovares de importancia clínica como *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*, que también contienen plásmidos virulentos específicos. El locus *spv* juega un papel clave en la patogenicidad ya que se ha visto que la incorporación de *spvRACBD* en cepas que han perdido el plásmido pSLT restaura la capacidad virulenta (Marcus *et al.*, 2000) (Matsui *et al.*, 2001) (Rotger & Casadesús, 1999). No se conoce mucho acerca de los genes *spv*, con excepción de *spvR* que codifica para un regulador transcripcional de 33 kDa, que comparte homología con los miembros de la familia LysR de activadores transcripcionales, y de SpvB que es una mono (ADP-ribosil) transferasa con capacidad de ribosilar la actina (Caldwell & Gulig, 1991) (Tezcan-Merdol *et al.*, 2005).

### 1.2.4.2 Bacteriófagos

Todos los bacteriófagos conocidos del género *Salmonella* pertenecen al orden *Caudovirales*. Análisis proteómicos permitieron clasificarlos en 5 grupos: tipo P27 (ST64B), tipo P2 (Fels-2, SopE $\Phi$  y PSP3), tipo P22 ( $\epsilon$ 34, ES18, P22, ST104 y ST64T), tipo T7 (SP6), los lambdoides (Gifsy-1, Gifsy-2 y Fels-1) y tres fagos independientes ( $\epsilon$ 15, KS7 y Felix O-1) (Kropinski *et al.*, 2007).

## 1.3 Procesos celulares de *Salmonella* de especial interés para este estudio

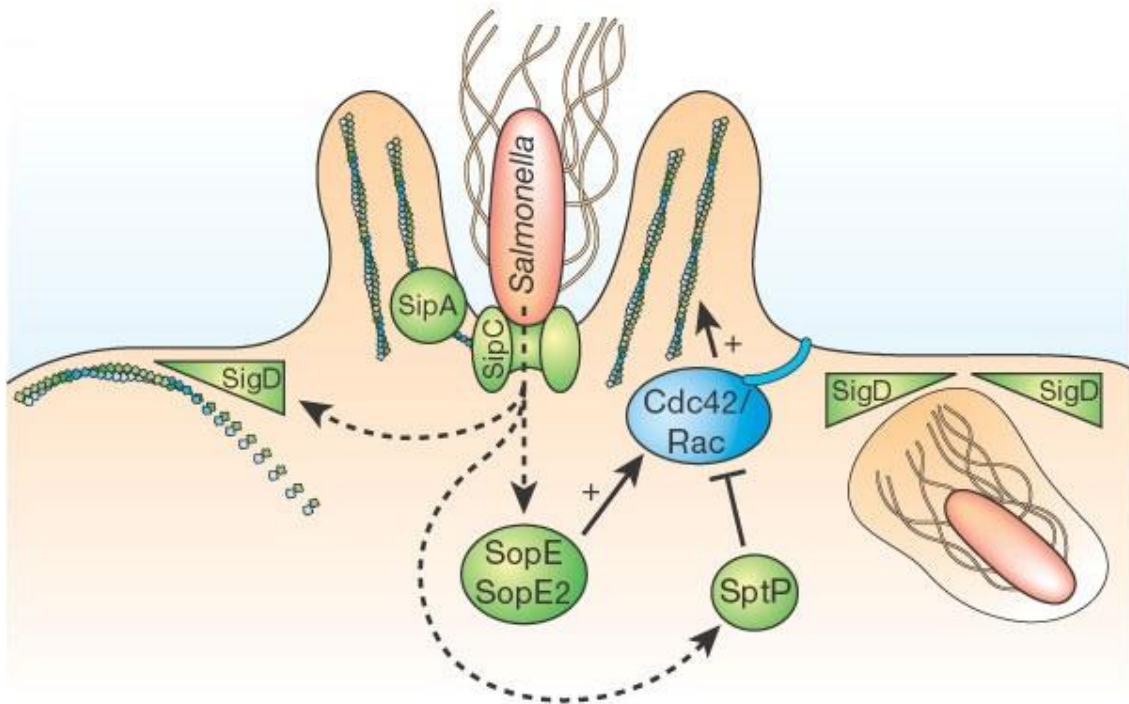
En este trabajo se han estudiado algunos procesos celulares que son descritos en especial detalle a continuación.

### 1.3.1 Invasión

El proceso de infección se inicia generalmente por la ingestión de comida o agua contaminadas, seguidas del paso de la bacteria desde el estómago hasta el intestino. Allí *Salmonella* se adhiere e invade el epitelio intestinal. Para el primer paso, la adhesión, las fimbrias juegan un papel importante en la elección de un linaje celular diana del hospedador. A continuación se iniciará el proceso de invasión de la célula hospedadora.

En general, las bacterias entran en las células eucariotas no fagocíticas por medio de dos mecanismos diferenciados de acuerdo a criterios morfológicos basados en cambios de la membrana. El mecanismo de “disparo” (*trigger*) involucra un reordenamiento importante del citoesqueleto de la célula hospedadora conocido como “ondulamiento” de membrana (*membrane ruffling*). En contraste, en el mecanismo de “cremallera” (*zipper*) o “mecanismo de entrada mediado por un receptor”, las bacterias invasoras están estrechamente ligadas a la membrana de la célula hospedadora, y sólo se llevan a cabo reordenamientos menores del citoesqueleto por el contacto específico entre ligandos bacterianos (invasina) y receptores de la superficie de la célula hospedadora (Velge *et al.*, 2012). *Salmonella* invade a las células epiteliales

mediante el mecanismo de “disparo” mediado por el T3SS de la SPI-1 y sus proteínas efectoras. Al menos 15 efectores pueden ser translocados en la célula hospedadora por T3SS-1 para inducir la entrada de las bacterias. Los cinco efectores considerados principales de *Salmonella* son SopE, SopE2, SopB, SipA, y SipC, siendo cada uno capaz de manipular la maquinaria del citoesqueleto dentro de la célula hospedadora (McGhie *et al.*, 2009) (figura 1.3). Las características de estas proteínas efectoras están detalladas en el apartado 1.2.1.1. El reordenamiento del citoesqueleto de actina iniciado por estos efectores, detectado a los 10-30 minutos, es transitorio ya que al cabo de 2-3 horas después de la entrada de la bacteria, se observa un citoesqueleto de actina normal a pesar de la presencia de un gran número de bacterias intracelulares. Estas proteínas efectoras translocadas vía T3SS-1, también podrían estar involucradas en otros procesos posteriores a la invasión como el tráfico de membrana, división celular, apoptosis, y producción de citoquinas como las quimioquinas (Santos *et al.*, 2009).



**Figura 1.3** Proceso de invasión de *S. Typhimurium*. Se puede observar la participación de las proteínas efectoras secretadas por el T3SS codificadas en la SPI-1 y fuera de ella. Las proteínas SipA, SipC SigD, SopE y SopE2 facilitan el reordenamiento del citoesqueleto de actina. La

proteína SigD también está involucrada en el sellado de las invaginaciones de la membrana plasmática para formar vacuolas intracelulares. Tomado de (Gruenheid & Finlay, 2003).

Una vez finalizado el proceso de invasión, *Salmonella* utiliza un segundo T3SS codificado por la SPI-2 para liberar proteínas efectoras adicionales a través de la membrana de las vacuolas SCV al citoplasma, permitiendo la supervivencia y replicación de la bacteria dentro de la célula hospedadora (Malik-Kale *et al.*, 2011). *Salmonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las SCV, que se caracterizan por tener concentraciones limitantes de  $Mg^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  y un pH ácido. De hecho se ha demostrado que la acidificación dentro de la SCV es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria (Figuroa & Verdugo, 2005). Las SCV son espaciosas, permitiendo que los productos antibacterianos se diluyan. Además, se expresan genes que neutralizan a los péptidos catiónicos. Una proporción significativa de los macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales (Finlay & Falkow, 1997) (Sirard *et al.*, 1999).

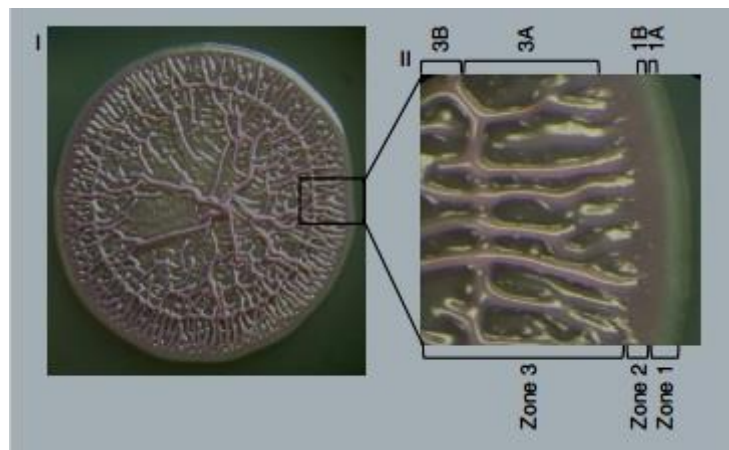
### 1.3.2 Formación de biofilm

Estudios realizados muestran que cuando los nutrientes del medio son abundantes y las condiciones ambientales son óptimas, *Salmonella* se reproduce exponencialmente y se mueve libremente. Sin embargo, cuando los nutrientes son escasos o cuando las condiciones de desarrollo se tornan severas, *Salmonella* crece más lentamente y secreta polímeros extracelulares que forman una estructura entrelazada en cuyo interior se alojan las células bacterianas, denominada biofilm (Costerton *et al.*, 1987). La formación del biofilm es importante para la propagación de *Salmonella* ya que este biofilm es resistente a desinfectantes, estreses medioambientales, antibióticos y al sistema inmune de la célula hospedadora, promoviendo la supervivencia de la bacteria y facilitando su posterior dispersión (Berger *et al.*, 2010) (Gerstel & Römling, 2001) (Solano *et al.*, 2002). La formación de biofilm está asociada con brotes de Salmonelosis e infecciones persistentes en pacientes (Bae *et al.*, 2012) (Bowen *et al.*, 2006) (Crawford *et al.*, 2010) (Zhao *et al.*, 2011). La formación de biofilm



se relaciona con el comportamiento multicelular, denominado morfotipo rdar de *S. Typhimurium* (detalles en figura 1.4), caracterizado por la formación de colonias extendidas con superficie seca sobre placas de agar conteniendo el colorante rojo Congo (Congo red, de ahora en adelante), (Austin *et al.*, 1998) (Römling *et al.*, 1998).

Aunque el biofilm provee muchas ventajas a la bacteria, su formación conlleva un gran gasto energético, por lo tanto está regulada en respuesta a cambios medio ambientales tales como la temperatura, pH y osmolaridad (Römling *et al.*, 2003). Estudios han revelado mecanismos moleculares ligados a la formación de biofilm con estreses ambientales, mostrando que múltiples reguladores transcripcionales transducen señales desde el medio ambiente extracelular al regulador principal de la formación de biofilm codificado en el gen *csgD* (*curli subunit gene D*) (Gerstel *et al.*, 2003). CsgD integra estas señales y sincroniza la síntesis de varios constituyentes importantes de la matriz extracelular que forma el biofilm (Latasa *et al.*, 2005). Una vez el biofilm se ha formado, surgen nuevas características en las bacterias dentro de estos agregados multicelulares, tales como aumento de la resistencia a las condiciones desfavorables, el aumento de la virulencia y la alteración del metabolismo (Liu *et al.*, 2014).



**Figura 1.4.** Colonia de *S. Typhimurium* con el morfotipo rdar (*red, dry and rough*/rojo, seco y rugoso), crecida en placas de agar Congo red a 28 °C por 3 días. I. 6x y II. 40x. La morfología de la colonia se puede dividir en 3 zonas principales basadas en la estructura y el color. Zona 1: región estrecha al borde de la colonia caracterizada por ser lisa y blanca, indicando la ausencia

de expresión de los componentes de la matriz extracelular (curli y celulosa). Zona 2: es una región estrecha, roja y suave indicando curli moderados y expresión de celulosa. Zona 3: se caracteriza por una topología muy elaborada de superficie rugosa y un color rojo profundo, lo que sugiere una alta expresión de curli y celulosa. Las zonas 1 y 3 se pueden subdividir en A y B, atendiendo al color y estructura, respectivamente. Modificado de (Simm *et al.*, 2014).

### 1.3.2.1 CsgD regula la formación de biofilm en *Salmonella*

Los principales constituyentes de la matriz extracelular del biofilm de *Salmonella* son la celulosa, fimbrias curli, proteínas asociadas al biofilm (Bap), cápsula del antígeno O, lipopolisacáridos y ADN extracelular (Latasa *et al.*, 2005). La celulosa, polímero  $\alpha\beta$ -1-4-D-glucosa, es una importante sustancia polimérica extracelular (EPS) asociada al biofilm que se entreteje con otros componentes extracelulares formando estructuras tridimensionales, para promover las interacciones célula-célula y proteger las células del entorno desfavorable. Su síntesis requiere genes codificados en los operones *bcsABZC-bcsEFG*. Las fimbrias curli, estructura proteica de tipo amiloide, son otro componente importante de la matriz extracelular en el biofilm y están codificadas por los operones *csgBAC-csgDEFG* (Barnhart & Chapman, 2006). BapA es una proteína grande rica en prolina-treonina, esencial para la agregación bacteriana y la posterior formación de la película en la interface aire/líquido en medio LB (Cucarella *et al.*, 2001). BapA está codificada por *bapA* y es secretada a la superficie celular por un sistema de secreción de tipo I genéticamente ligado al operón *bapBCD*. La cápsula de antígeno O es crucial para la formación de biofilm de *S. Typhimurium* y *S. Typhi* en cálculos biliares (Crawford *et al.*, 2008).

La síntesis de los componentes de la matriz extracelular del biofilm de *Salmonella* está regulada por una red compleja que incluye muchos componentes como factores sigma, factores de transcripción, varios mensajeros secundarios y pequeños ARNs reguladores. Como regulador transcripcional principal, CsgD es la unidad de integración que controla la formación de biofilm de *Salmonella* (Gerstel & Römling, 2003). La producción de curli se activa directamente por la unión del factor de transcripción CsgD en estado no fosforilado al promotor del operón *csgBAC* (Hamilton *et al.*, 2009), que codifica

la subunidad mayor CsgA, así como la proteína CsgB. CsgD también regula la síntesis de celulosa, controlando la expresión de la diguanilato ciclasa AdrA que cataliza la síntesis de c-di-GMP. c-di-GMP controla a nivel post-transcripcional la actividad de varias sintetetasas de celulosa incluyendo BcsB (Zorraquino *et al.*, 2013).

Grantcharova *et al.*, (2010) identificaron que la expresión de CsgD es biestable: una subpoblación de bacterias en biofilm tiene un alto nivel de expresión CsgD, mientras que en el resto, la expresión de CsgD es baja. Las bacterias con sobreexpresión CsgD son responsables de generar la matriz extracelular para la formación de la estructura del biofilm que recubrirá también a las bacterias que expresan bajos niveles de CsgD. El ahorro energético en producción de biofilm gracias a la expresión biestable de *csgD*, confiere ventajas adicionales para toda la comunidad bacteriana, manteniendo el potencial de desarrollo de la población (Liu *et al.*, 2014).

### **1.3.2.2 Interacción entre CsgD y otros reguladores en la formación de biofilm**

Durante mucho tiempo se ha sabido que diferentes factores ambientales (temperatura, nutrientes e inanición, tensión de oxígeno, osmolaridad, hierro y pH) tienen efectos importantes en la producción del biofilm y su composición. Estos factores afectan la formación del biofilm de *Salmonella* actuando sobre la expresión de CsgD a través de diversos mecanismos (White *et al.*, 2008). La región intergénica entre los operones *csgBAC* y *csgDEFG*, actúa como un centro para la integración de diferentes señales ambientales proporcionando sitios de unión con múltiples factores de transcripción (Gerstel *et al.*, 2003). Al entrar en fase estacionaria de crecimiento, RpoS se une a la ARN polimerasa iniciando la transcripción del *csgD* (Hengge-Aronis, 2002). La actividad del complejo RpoS-ARN polimerasa se ve favorecida por la proteína accesoria Crl, una proteína de unión al ADN, que también se acumula en fase estacionaria. Crl es más estable a bajas temperaturas (28 °C) que a altas temperaturas (37 °C). *Salmonella* forma

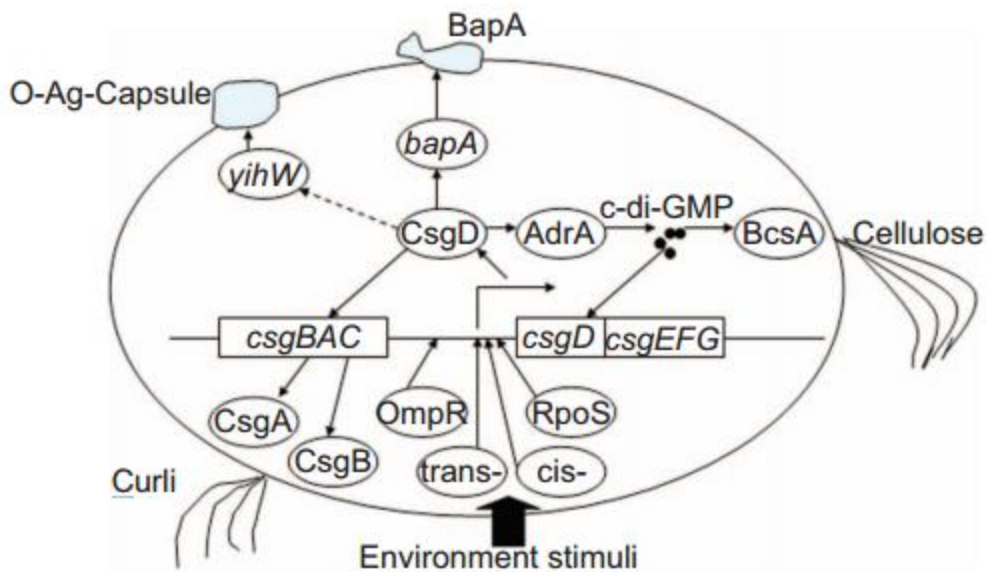
biofilm a 28 °C, indicando que Crl sirve como un sensor de temperatura en la formación de biofilm (Steenackers *et al.*, 2012).

Entre los múltiples factores de transcripción que se unen a la secuencia del promotor de *csgD*, se encuentran OmpR, IHF, H-NS y MlrA (figura 1.5). OmpR, el regulador del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, es fosforilada en respuesta a estímulos ambientales tales como la osmolaridad y el pH y se une al promotor de *csgD* para estimular su expresión (Gerstel *et al.*, 2006). IHF es una proteína implicada en una gran variedad de procesos celulares y se une a secuencias en el promotor *csgD* promoviendo la activación y/o represión (Dillon & Dorman, 2010). H-NS como proteína estructural del ADN que responde a una amplia gama de estímulos ambientales, tales como la osmolaridad y la temperatura, se une a sitios ricos en A-T en la región intergénica *csgBAC-csgDEFG* y tiene efectos sobre la expresión de *csgD* (Gerstel *et al.*, 2003) (Navarre *et al.*, 2006). Por su parte, MlrA, cuya expresión está regulada por RpoS, se une aguas arriba del promotor *csgD* e induce la transcripción del gen *csgD*. MlrA actúa específicamente sobre la transcripción del operón *csgDEFG* principalmente en respuesta a iones metálicos (Brown *et al.*, 2003).

c-di-GMP es un mensajero secundario que interviene en la regulación de numerosos procesos biológicos, incluyendo la formación de biofilm, motilidad, virulencia, ciclo y diferenciación celular (Sambanthamoorthy *et al.*, 2012). La síntesis del c-di-GMP se produce a través de las enzimas diguanilato ciclasa (DGC) que contienen el dominio GGDEF, mientras que la degradación se produce vía fosfodiesterasas (PDE) con dominios EAL o HD-GYP (Schmidt *et al.*, 2005). La delección de las DGC, elimina completamente la formación de biofilm, sugiriendo que el c-di-GMP es esencial para este proceso bacteriano (Solano *et al.*, 2009).

Por último, hay pequeños ARNs involucrados en la regulación de la formación de biofilm (Mika & Hengge, 2013). La mayoría de estos pequeños ARNs son de 80-200 nt de longitud y se unen directamente a sus ARNm diana en el 5'-UTR o en la pauta de lectura abierta para ejecutar su actividad de regulación cambiando

la exposición de la secuencia Shine-Dalgarno de los ARNm a los ribosomas o alterando la estabilidad del ARNm (Holmqvist *et al.*, 2010). La chaperona Hfq protege a los pequeños ARNs de la degradación y facilita su unión a los ARNm diana. Recientemente, se encontraron pequeños ARNs Hfq-dependientes (ArcZ y SdsR) que afectan positivamente la expresión de *csgD* y la formación de biofilm (Zeng *et al.*, 2013).



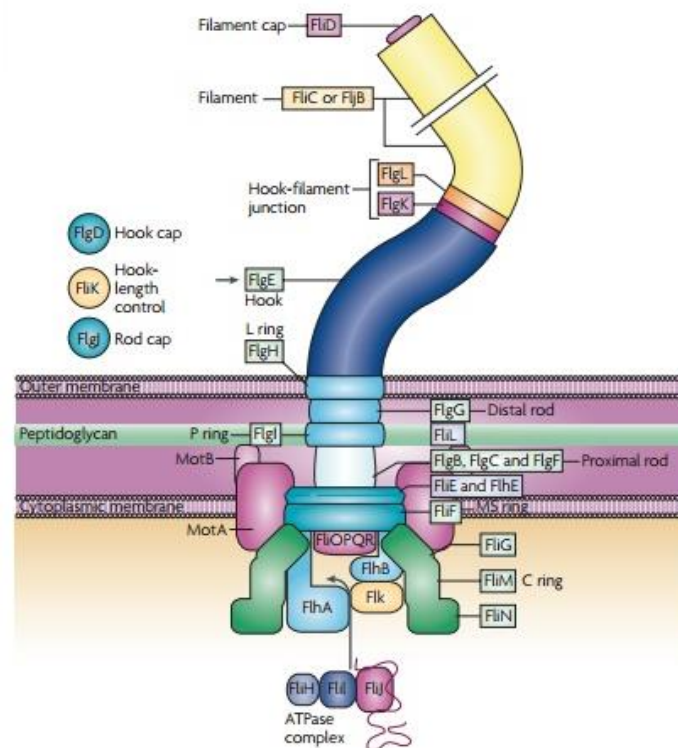
**Figura 1.5** Regulación de la formación de biofilm de *Salmonella*. Múltiples factores de transcripción se unen a la secuencia del promotor de *csgD* y regulan su transcripción, incluyendo *OmpR*, *IHF*, *H-NS* y *MlrA*. Estímulos ambientales como temperatura, nutrientes, oxígeno, osmolaridad, y pH también intervienen en la formación de biofilm y su composición. Tomado de (Liu *et al.*, 2014).

### 1.3.3 Papel del flagelo y las fimbrias de tipo 1 en la invasión de *Salmonella*

El flagelo y las fimbrias de tipo 1 también han sido implicados en la patogenicidad de *Salmonella*. El flagelo se define como largos filamentos proteicos helicoidales conectados a motores rotativos integrados dentro de la membrana que permiten a la bacteria nadar en líquidos (*swimming*) y moverse sobre superficies (*swarming*) (Chilcott & Hughes, 2000). Los flagelos, se cree, facilitan la patogenicidad al permitir que *Salmonella* nade a los sitios de la invasión (Schmitt

*et al.*, 2001). Además de la motilidad, el flagelo activa la expresión de citoquinas proinflamatorias (Miao *et al.*, 2006) (Franchi *et al.*, 2006).

Análisis bioinformáticos demostraron que el T3SS de la SPI-1 comparte características con el sistema flagelar (Van Gijsegem *et al.*, 1995). Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la finalidad de la secreción de la proteína en los dos sistemas. En el caso del flagelo, las proteínas secretadas están enfocadas principalmente al ensamblaje del flagelo. El sistema de secreción de tipo 3 flagelar (fT3SS) exporta subunidades proteicas que se ensamblan en un flagelo funcional y factores reguladores que controlan el proceso de ensamblaje (Figura 1.6) (Singer *et al.*, 2014).



**Figura 1.6** Componentes flagelares de *S. Typhimurium*. Los componentes citoplasmáticos solubles incluyen el complejo ATPasa FliH–FliI–FliJ, el cual secreta un número de sustratos y ayuda a determinar el orden de la secreción. El filamento proteico consiste en FliC o FliB, los cuales se transcriben alternativamente. FlgJ y FlgD están transitoriamente asociados con el flagelo durante la polimerización de la “barra” (*rod*) y el “gancho” (*hook*), respectivamente. FliK se secreta durante la polimerización de la “barra” y el “gancho”. Tomado de (Chevance & Hughes, 2008).

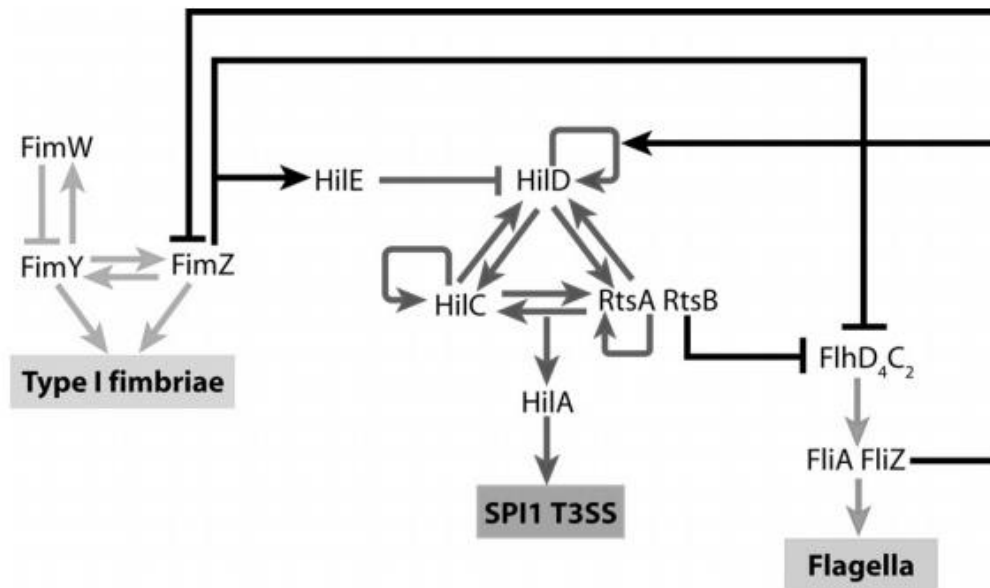
El alto coste energético de la síntesis del flagelo hace que esté controlado en respuesta a diversos factores y de acuerdo a las necesidades de la motilidad de la bacteria. En condiciones de bajos nutrientes, la expresión génica flagelar se reprime en *Salmonella* (Zhao *et al.*, 2007) (Wada *et al.*, 2011). La expresión y montaje de los genes flagelares son reprimidos al inicio de la formación de biofilm, al inicio de la invasión de las células epiteliales y durante la supervivencia dentro de los macrófagos (Wada *et al.*, 2011) (Hautefort *et al.*, 2008) (Beloin & Ghigo, 2005) (Eriksson *et al.*, 2003) (Cummings *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha detectado inducción de la expresión de genes flagelares tras la invasión de las células epiteliales, entre 4 y 6 horas después de la entrada en la célula hospedadora (Cummings *et al.*, 2006) (Hautefort *et al.*, 2008).

Por su parte, las fimbrias de tipo 1 son apéndices en forma de cabello que llevan adhesinas específicas que interaccionan sobre la superficie de las células eucariotas (Ewen *et al.*, 1997). Las fimbrias de tipo 1 están involucradas en patogenicidad ya que facilitan la unión de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino (Bäumler *et al.*, 1996). Múltiples estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre el T3SS de la SPI-1, el flagelo y las fimbrias de tipo 1 (Iyoda *et al.*, 2001) (Clegg & Hughes, 2002) (Ellermeier & Slauch, 2003) (Baxter & Jones, 2015). En la figura 1.7 se resumen los detalles de este *cross talk* entre los tres sistemas. El regulador principal de los genes flagelares es el complejo FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> que activa dos reguladores adicionales, FliA y FliZ, que están codificados dentro del operón *fliAZ* (Chilcott & Hughes, 2000). FliA es un factor sigma alternativo específico del flagelo, esencial para la expresión de los genes del motor, el filamento y la quimiotaxis. FliZ es un activador post-transcripcional de FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (Saini *et al.*, 2008). FliZ también activa HilD y reprime FimZ post-transcripcionalmente (Iyoda *et al.*, 2001) (Kage *et al.*, 2008) (Lin *et al.*, 2008) (Lucas & Lee, 2001) (Van Immerseel *et al.*, 2008) (Saini *et al.*, 2010). Por otro lado, RtsB codificado dentro del mismo operón de RtsA, proteína que forma el bucle positivo con HilC y HilA en la regulación de la expresión de *hilA* en la SPI-1 (apartado 1.2.1.2), se une al promotor *flhDC* y reprime la motilidad (Ellermeier & Slauch, 2003).

FimZ junto con FimW forman un bucle de activación y autoactivación. Ambas proteínas también tienen la capacidad de activar de manera independiente la expresión del promotor *fimA*, el cual controla la expresión de genes que codifican para las fimbrias de tipo 1. FimZ también se une al promotor *flhDC* y reprime la expresión de genes flagelares e induce la expresión de HilE para reprimir la expresión de los genes de la SPI-1 (Clegg & Hughes, 2002) (Baxter & Jones, 2005) (Saini *et al.*, 2009). Saini *et al.*, (2010) argumentaron que la pérdida de la expresión del gen flagelar y la motilidad, que se reprime durante el crecimiento intracelular, se podría deber a la necesidad de la bacteria a permanecer inmóvil después de una invasión exitosa. No obstante, Singer *et al.*, (2014), en un reciente trabajo identificaron que HilD es un regulador positivo de los genes de expresión flagelar. HilD activa transcripcionalmente la expresión de *flhDC* al unirse a la región comprendida entre los nucleótidos -68 y -24 aguas arriba del inicio de la transcripción; y muestran que en contraste con previos trabajos, HilA no afecta la expresión de los genes del flagelo.

La activación del sistema flagelar a través de HilD y la inactivación simultánea a través de RtsB respaldan una doble, o incluso una múltiple interacción entre el flagelo y la regulación de la expresión de los genes de la SPI1. Por lo tanto, dependiendo del nicho ambiental y la etapa espacio-temporal de la invasión, el regulador HilD podría activar la transcripción *flhDC* a través de la unión directa al promotor *flhDC* o reprimir la transcripción *flhDC* a través de la activación de RtsB. Singer *et al.*, (2014) concluyen que durante las primeras etapas de la invasión de células epiteliales, la expresión de genes SPI1 es inducida y la motilidad es reprimida, pero los genes flagelares están listos para ser inducidos inmediatamente en algún momento posterior durante la invasión por la activación a través de HilD. La secreción de las proteínas efectoras de la SPI1 resulta en la internalización de las células de *Salmonella* y la formación de las SCV. En este punto, la motilidad es, probablemente, no requerida ya que podría dificultar el proceso de invasión. En las células epiteliales, las proteínas flagelares se reprimen durante los primeros estados de la invasión (2 horas después de la invasión), mientras que la expresión simultánea de SPI1 y genes flagelares se reprimen de 4 a 6 horas después de la invasión (Hautefort *et al.*, 2008).





**Figura 1.7** Resumen del *cross talk* entre los sistemas de regulación de la expresión de los genes que codifican para las fimbrias de tipo 1, el T3SS de la SPI-1 y el flagelo. Los genes de este *cross talk* son expresados en una jerarquía temporal durante la invasión, que es iniciada por los genes flagelares, seguido por los genes de la SPI-1 y finalmente por las fimbrias de tipo 1. Tomado de (Saini *et al.*, 2010).

#### 1.4 ARN polimerasa, enzima que cataliza la transcripción

La expresión génica se inicia con el proceso de transcripción, que se define como el proceso por el cual se sintetiza ARN a partir de una molécula de ADN. En este proceso se sintetizan tanto los ARN estables—ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr)—ambos implicados en la síntesis de proteínas, como los ARN no estables, tanto los codificantes para proteínas, ARN mensajeros (ARNm), como los conocidos como ARN no codificantes o pequeños ARNs, implicados en la regulación de la expresión génica. Todos los organismos celulares utilizan un complejo enzimático ADN dependiente para sintetizar ARN, la ARN polimerasa (ARNpol).

##### 1.4.1 La ARN polimerasa

En bacterias existe una única ARNpol, mientras que en organismos eucariotas existen tres tipos de ARNpol que transcriben genes diferentes, la ARNpol-I se

encarga de transcribir la mayoría de los ARNr, la ARNpol-II transcribe los ARNm y la ARNpol-III transcribe los ARNt y el ARNr 5s. La versatilidad de la ARNpol bacteriana depende de interacciones dinámicas con cofactores así como de la secuencia de ADN, permitiéndole responder apropiadamente a las necesidades transcripcionales de la célula en cada momento (Ghosh *et al.*, 2001).

La ARNpol procariota es un enzima de gran tamaño, unos 400 kDa, formado por varias subunidades: dos subunidades  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\beta'$  y una  $\omega$ . Este enzima multimérico,  $\alpha_2\beta\beta'\omega$ , es conocido como núcleo de la ARNpol, una estructura con forma de pinza de cangrejo "*crab-claw-like structure*". Las subunidades  $\alpha$  actúan de soporte para las dos subunidades catalíticas,  $\beta$  y  $\beta'$ , que son las que le dan la forma de pinza de cangrejo. Por último, la subunidad  $\omega$  tiene una función estructural, ya que sirve de unión entre el complejo  $\alpha_2\beta$  y  $\beta'$  (Ghosh *et al.*, 2001). Las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  forman el canal primario de la ARNpol, una hendidura cargada positivamente, que alberga el centro catalítico del enzima. En este canal, que aloja la cadena de ADN durante la transcripción, se coordinan dos iones  $Mg^{+2}$ , los cuales son imprescindibles para la actividad del enzima (Sosunov *et al.*, 2003). La ARNpol necesita de la unión con una subunidad  $\sigma$ , para iniciar el proceso de transcripción. La unión del núcleo y la subunidad  $\sigma^{70}$  se conoce como el holoenzima de la ARNpol (Haugen *et al.*, 2008). La subunidad  $\sigma$  que reconoce la secuencia promotora, interacciona con las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ , y posiciona de forma apropiada la ARNpol para promover el inicio del proceso de transcripción. *E. coli* contiene siete tipos diferentes de factores  $\sigma$  divididos en dos familias: 1) familia  $\sigma^{70}$  que incluye los factores  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{28}$ ,  $\sigma^{24}$  y  $\sigma^{fecI}$  y 2) familia  $\sigma^{54}$ . Por su parte, *Salmonella* presenta 5 factores sigma alterativos a parte del  $\sigma^{70}$  que son:  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{28}$ ,  $\sigma^{24}$  y  $\sigma^{54}$  (Ishihama, 2000) (Österberg *et al.*, 2011).

#### 1.4.2 Etapas de la transcripción

La transcripción es un proceso cíclico que puede ser dividido en tres etapas: 1) reconocimiento de la secuencia promotora e inicio de la transcripción, 2) elongación de la cadena de ARN y 3) terminación de la transcripción (Figura 1.8).

### - Reconocimiento del promotor e inicio de la transcripción

En este primer paso del proceso de la transcripción, la secuencia de ADN tiene un papel determinante. La ARNpol reconocerá unas secuencias señal en la cadena de ADN por las que muestra una elevada afinidad para unirse e iniciar la transcripción, en este reconocimiento juegan un papel clave las subunidades  $\sigma$ . La mayoría de los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  contienen dos elementos de reconocimiento, las cajas -35 y -10 contando a partir del lugar de inicio de la transcripción (+1). Estas cajas corresponden a unas secuencias de 6 pb cuyas secuencias consenso son TTGACA y TATAAT respectivamente (Hook-Barnard *et al.*, 2006). La región comprendida entre estas dos zonas se conoce como espaciador. El tamaño de este espaciador está conservado ( $17 \pm 1$  pb) en la mayoría de genes, pero no su secuencia (deHaseth & Helmann, 1995). Además de las regiones -10 y -35, pueden existir otros elementos localizados en diferentes posiciones que contribuyen al reconocimiento específico por el holoenzima y a la fuerza del promotor para iniciar la transcripción. Estos elementos son el “*UP-element*” situado aguas arriba de la caja -35, la secuencia discriminadora localizada entre la caja -10 y el nucleótido de inicio de la transcripción y la extensión de la caja -10 que consta de 3-4 pb antes o después de dicha secuencia (Estrem *et al.*, 1998) (Hook-Barnard *et al.*, 2006).

Durante el deslizamiento del holoenzima por el ADN, las secuencias -35 y -10 son reconocidas por el factor  $\sigma$  y el “*UP-element*” en caso de existir, por los extremos C-terminales de las subunidades  $\alpha$ . En este momento el holoenzima forma un complejo con la doble cadena de ADN, formando el denominado complejo cerrado (RPc). En este paso la ARNpol cubre aproximadamente desde la base -50 hasta la +5 respecto al inicio de transcripción (Li & McClure, 1998). La transición al estado de complejo abierto (RPo), es decir, la apertura de las hebras de ADN, se lleva a cabo por la acción de unos residuos aromáticos de la subunidad  $\sigma$  que desestabilizan el ADN y lo abren de la posición -11 hasta la posición -7 (Murakami *et al.*, 2002). A continuación, se introduce en el holoenzima una secuencia más extensa de unos 20 pb, incluyendo el nucleótido +1, formándose el RPo (Sergei Borukhov & Nudler, 2008). La separación de la

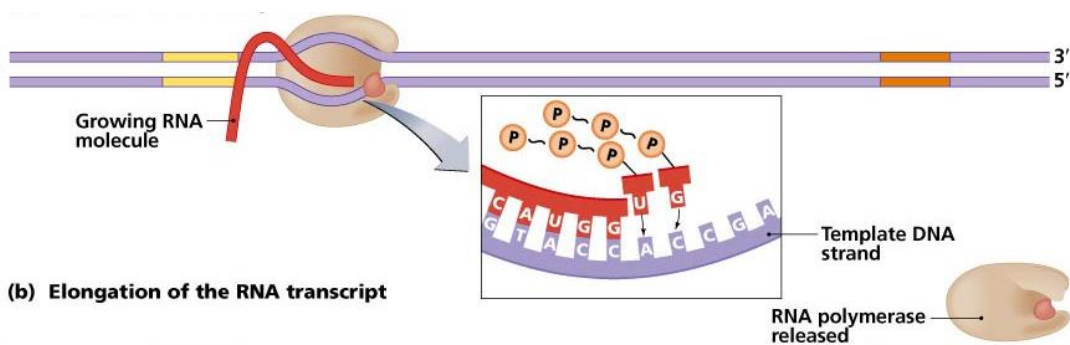
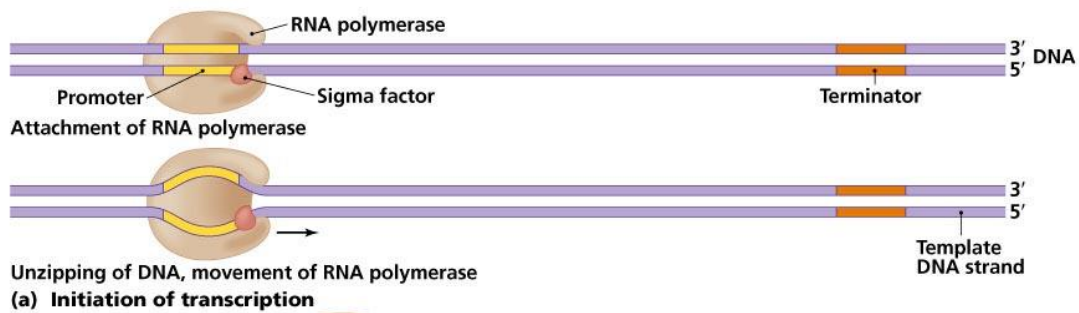
doble hélice permite el correcto posicionamiento del nucleótido +1 del ADN en el centro catalítico del holoenzima, permitiendo el primer paso del inicio de la transcripción, la entrada del nucleótido trifosfato inicial (NTPi) de la nueva cadena de ARN.

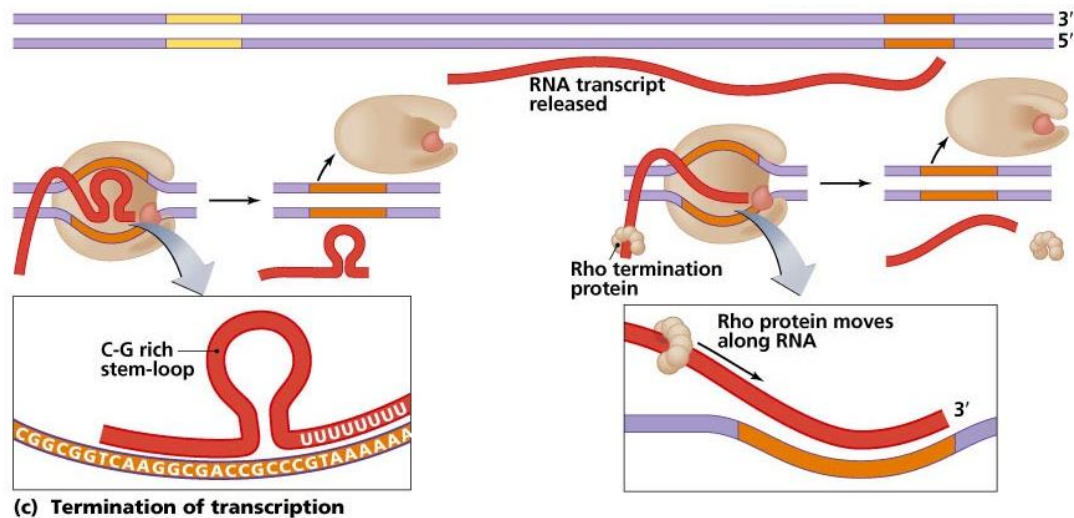
El proceso enzimático comienza con la entrada y unión al NTPi del nucleótido correspondiente a la posición +2 y la formación en el centro catalítico del primer enlace fosfodiéster entre los dos nucleótidos. Tras la liberación del pirofosfato resultante de la formación del enlace, el dinucleótido sintetizado se mueve con el ADN, para añadir el siguiente NTP. Este proceso se repite varias veces hasta que el producto de ARN adquiere una longitud de 7 a 10 nucleótidos, formándose el complejo de inicio de la transcripción (RPitc). Durante este proceso, las regiones -10 y -35 permanecen fuertemente unidas al holoenzima a través de la subunidad  $\sigma$ . Esto provoca que la ARNpol no se desplace y se produzca el fenómeno conocido como “*scrunching*”, durante el cual las cadenas de ADN y la de ARN nueva se van comprimiendo en el interior del enzima. Esta compresión conlleva una gran acumulación de energía libre, que puede llegar a ser superior a la energía de la interacción entre la subunidad  $\sigma$  y la secuencia promotora, liberándose entonces el holoenzima y escapándose del promotor, iniciándose a continuación el segundo paso de la transcripción, la elongación del ARN. Sin embargo, en muchos casos la energía acumulada se libera antes de producirse el escape del promotor, rompiéndose el híbrido ADN-ARN naciente, lo que conlleva la liberación de productos de ARN abortivos y la restauración del RPo. Este fenómeno se conoce como ciclos abortivos de iniciación (Borukhov & Nudler, 2008).

#### - **Elongación y terminación de la transcripción**

En la mayoría de los casos, cuando el núcleo de la ARNpol se escapa del promotor y comienza la fase de elongación de la transcripción se libera la subunidad  $\sigma$ , ocasionalmente puede continuar unida al núcleo de la ARNpol durante un corto período de tiempo de la elongación, sin que ello signifique un obstáculo para el proceso de transcripción (Reppas *et al.*, 2006). Tras

desprenderse la subunidad  $\sigma$  hablamos de complejo de elongación (EC). Durante la fase de elongación el complejo ADN-ARNpol puede oscilar entre complejo activo y complejo inactivo o pausado (Komissarova & Kashlev, 1997). En la conformación activa, el centro catalítico del núcleo de la ARNpol está preparado para albergar un nuevo NTP. Por diferentes motivos si el desplazamiento de la ARNpol a lo largo de la molécula del ADN no tiene lugar, el centro catalítico estará ocupado por ARN e inactivo, se dice que se ha producido una pausa durante el proceso de elongación. La situación de pausa del complejo de elongación no conduce directamente a una disociación entre el núcleo de la ARNpol y el ADN. La frecuencia y duración de las pausas determinan la tasa de elongación de la ARNpol, y también pueden influir en el proceso de terminación (McDowel *et al.*, 1994) (Gusarov & Nudler, 1999).





Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Figura 1.8** Etapas de la transcripción. **A.** Inicio de la transcripción. La ARNpol reconoce la secuencia de ADN y las cajas -35 y -10 características de los promotores dependientes del factor  $\sigma^{70}$  y se produce la separación de la hebra del ADN. **B.** Elongación de la transcripción. Comienza cuando el núcleo de la ARNpol se escapa del promotor. La elongación continúa hasta que la ARNpol encuentre una señal de terminación. **C.** Terminación. Si es intrínseca consiste en una zona rica en G-C que puede formar un bucle, seguida de una zona rica en U. Esta serie de G-C forma una horquilla muy fuerte, similar a las que se pueden dar en las zonas de pausa de la elongación, lo que provoca la disociación del complejo ARN, ADN y ARNpol en la región rica en U. En la terminación dependiente de Rho, se produce la unión de la proteína Rho a una secuencia específica denominada *rut* (Cummings, 2006).

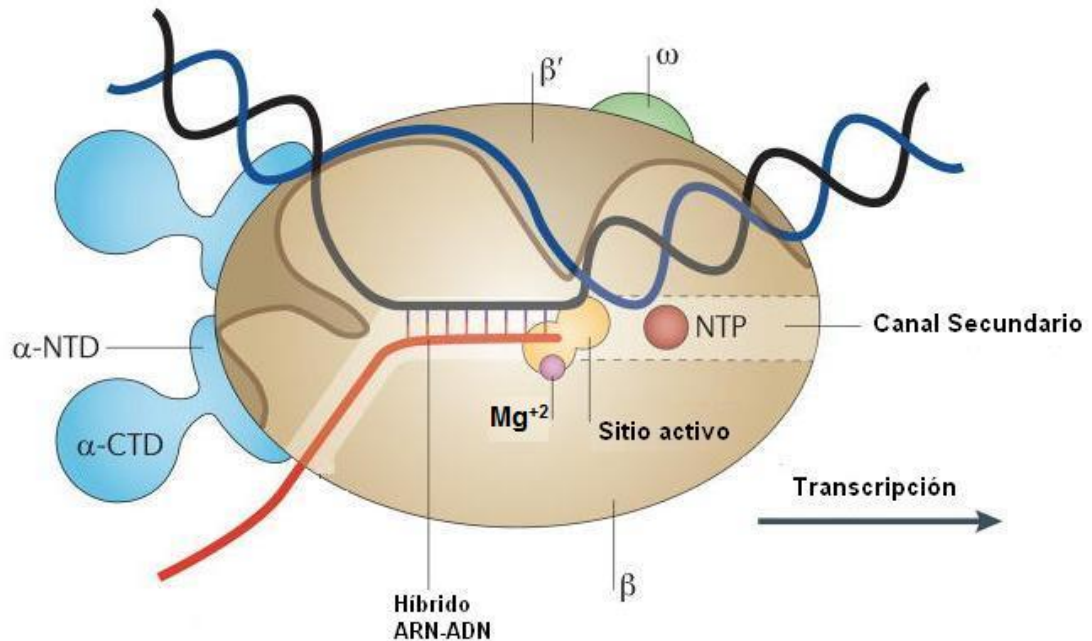
Estas pausas durante la elongación pueden tener lugar principalmente por dos mecanismos diferentes, dependiendo de la formación o no de una horquilla o bucle en la molécula de ARN naciente (Artsimovitch & Landick, 2000) (Roberts *et al.*, 2008). La formación de una horquilla en el extremo 5' del ARN naciente parece provocar un cambio estructural del centro activo de la ARNpol, impidiendo la adición de NTP al extremo 3' de la molécula de ARN naciente (Toulokhonov *et al.*, 2007). En otros casos, la pausa no se correlaciona con la formación de estructuras secundarias en la molécula de ARN naciente, pero se ha observado que se produce un retroceso de la ARNpol respecto al ARN naciente, de forma que el centro catalítico no contiene el extremo 3' hidroxilo del ARN naciente, si no que contiene un nucleótido anterior (Roberts *et al.*, 2008).

Existen diferentes mecanismos de resolución de estos complejos pausados de la transcripción. La proteína NusA puede ayudar a resolver los estados pausados, especialmente los que se generan por la formación de una horquilla, mientras que la proteína NusG resuelve las situaciones de pausa provocadas por un retroceso de la ARNpol (Roberts *et al.*, 2008). Existen otras proteínas implicadas en la resolución de los complejos pausados como son las proteínas RfaH o los factores Gre. Éstos últimos promueven la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol cuando esta se encuentra en estado pausado donde ha habido un retroceso. La ARNpol corta la cadena de ARN naciente en el extremo 3', dejando un nuevo extremo apropiadamente posicionado en el centro activo de la ARNpol. Los factores Gre, los cuales han sido objeto de estudio en el presente trabajo, se encuentran descritos con mayor detalle en el apartado 1.5. La elongación continúa hasta que la ARNpol encuentra una señal de terminación. Se conocen dos tipos de señales de terminación; una señal intrínseca al ARN, también conocida como Rho-independiente, y la Rho-dependiente.

La señal de terminación intrínseca consiste en una zona rica en G-C que puede formar un bucle, seguida de una zona rica en U (Henkin, 2000). Este bucle, similar a los que se pueden dar en las zonas de pausa de la elongación, provoca la disociación del complejo ARN, ADN y ARNpol en la región rica en U. En la terminación dependiente de Rho, se produce la unión de la proteína Rho a una secuencia específica denominada *rut*. La proteína Rho tiene actividad helicasa, dependiente de ATP, y provoca la liberación del transcrito de la ARNpol (Ciampi, 2006). Al igual que la iniciación de la transcripción, la elongación y la terminación son procesos con gran dinamismo, regulados en múltiples puntos.

En la ARNpol se ha descrito la existencia de un espacio denominado canal secundario de la ARNpol. Es una abertura que pone en contacto el medio externo con el centro catalítico del enzima. Este canal es la entrada de los nucleótidos necesarios para formar la cadena de ARN durante la transcripción (Figura 1.9). Además, diferentes factores reguladores utilizan este canal para tener acceso directo al centro catalítico de la ARNpol. Entre estos factores encontramos el ppGpp, DksA y los factores Gre. Los factores Gre interaccionan con el  $Mg^{+2}$  del

centro catalítico modulando, de esta manera, la actividad de la ARNpol (Perederina *et al.*, 2004) (Borukhov *et al.*, 2005).



**Figura 1.9** Representación de un complejo ADN-ARN/ARNpol. La doble cadena de ADN compuesta de la cadena molde (negro), la cadena complementaria (azul) y el ARN naciente (rojo). El dominio  $\alpha$ -amino-terminal ( $\alpha$ -NTDs) sirve como andamio para la formación del complejo, el dominio  $\alpha$ -carboxi-terminal ( $\alpha$ -CTDs) y la subunidad  $\omega$  juegan un papel de regulación durante la iniciación. Se representa el sitio activo y el canal secundario de la ARNpol. Modificado de (Santangelo & Artsimovitch, 2011).

### 1.4.3 Factores que interaccionan con el canal secundario de la ARN polimerasa

En *E. coli*, varios factores tienen la capacidad de interactuar con el canal secundario de la ARNpol y afectar su actividad. Con excepción de ppGpp, que es un nucleótido modificado, el resto de factores son proteínas de bajo peso molecular con similar organización espacial (Browning & Busby, 2004) (Haugen *et al.*, 2008) (Lamour *et al.*, 2008) (Blankschien *et al.*, 2009) (Stepanova *et al.*, 2009). Estas proteínas presentan un dominio que encaja perfectamente dentro



del canal secundario e interaccionan con el centro activo de la ARNpol, y un segundo dominio que se mantiene por fuera del canal secundario. En *E. coli*, estas proteínas son principalmente GreA, GreB (Borukhov *et al.*, 1993) y DksA (Perederina *et al.*, 2004).

El hecho de que estas proteínas puedan unirse al canal secundario de la ARNpol, sugiere que se podría generar una competencia entre los diferentes factores teniendo consecuencias en la funcionalidad de la holoenzima. A continuación, se describen cada uno de estos factores.

### 1.4.3.1 ppGpp

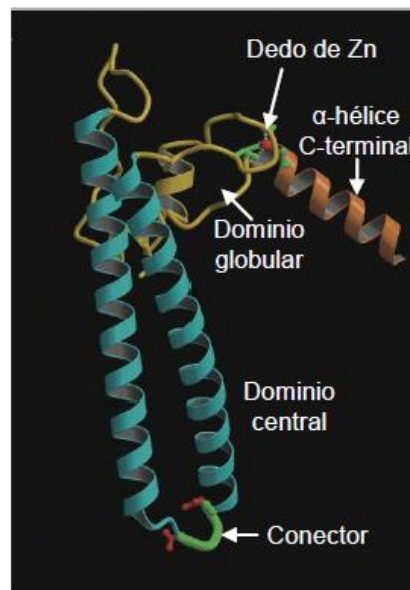
La alarmona (p)ppGpp, tetra- o penta-fosfato de guanosina, es un nucleótido modificado que actúa como mensajero secundario en respuesta a diferentes tipos de estrés. En enterobacterias su síntesis está catalizada por RelA y SpoT. RelA es la principal proteína productora de ppGpp en condiciones de carencia de aminoácidos. SpoT es capaz de sintetizar ppGpp en respuesta a otras condiciones de estrés y es el enzima responsable de su degradación (Cashel *et al.*, 1996). ppGpp es la molécula efectora de lo que se conoce como respuesta estricta, inicialmente descrita como la respuesta por la que se regula el número de ribosomas atendiendo a la cantidad de aminoácidos presentes en el medio. La represión de la producción de ribosomas en situaciones de carencia de aminoácidos tiene un efecto global en la célula causando una reducción de la síntesis proteica y de la tasa de crecimiento (Sands & Roberts, 1952) (Stent & Brenner, 1961). Se ha descrito que los niveles de ppGpp son indetectables en fase exponencial de crecimiento, incrementan drásticamente en el inicio de la fase estacionaria y posteriormente tras producirse una disminución, se mantienen niveles altos de ppGpp en la célula (Cashel, 1969). El pico más alto de producción de ppGpp coincide con la interfase entre fase exponencial y estacionaria. Se conocen otras situaciones de estrés, además de la carencia de aminoácidos, por las cuales se promueve la síntesis de ppGpp, como la falta de otros nutrientes o parámetros ambientales que provoquen una reducción importante en la tasa de crecimiento (Cashel *et al.*, 1996).

Pizarro-Cerdá & Tedin (2004) reportaron que ppGpp juega un importante papel como regulador de la expresión de los genes de virulencia en *S. Typhimurium*. Cepas de *Salmonella* mutantes *relA spoT*, por tanto deficientes en la síntesis de ppGpp (ppGpp<sup>0</sup>), mostraron ser no invasivas en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Estas cepas presentaban una reducción importante en la expresión de los genes *hilA* e *invF*, que como ya se ha explicado, codifican para los principales activadores transcripcionales de la SPI-1. Ninguna de las condiciones de crecimiento probadas que simulaban las condiciones intestinales, fueron capaces de inducir la expresión de *hilA* en ausencia de ppGpp. Más adelante, Thompson *et al.*, (2006) describieron que ppGpp estaría involucrado en la transducción de señales ambientales que regulan los genes de virulencia. Observaron que ppGpp era necesario para la expresión de *hilA*, *hilC*, *hilD* e *invF*, y por tanto, para la expresión de los genes de la SPI-1, en condiciones de oxígeno limitante. Por su parte, los genes codificados en SPI-2 mostraron dependencia por ppGpp bajo condiciones específicas de aireación y a finales de la fase exponencial.

Mediante microarrays y secuenciación de ARN (dRNA-seq), se ha confirmado que ppGpp es necesario para la expresión de casi todos los genes de la SPI-1 y SPI-2, además de otros genes de *Salmonella* relacionados con virulencia (Song *et al.*, 2004) (Thompson *et al.*, 2006) (Song *et al.*, 2010) (Ramachandran *et al.*, 2012). También se ha descrito que ppGpp está involucrado en la regulación de varios de los ARN no codificantes relacionados con virulencia en *Salmonella* (Ramachandran *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que ppGpp juega un papel importante en relación a la virulencia en varias bacterias incluyendo *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *V. cholera* y *Pseudomonas aeruginosa* (Aberg *et al.*, 2006) (Klinkenberg *et al.*, 2010) (Primm *et al.*, 2000) (Taylor *et al.*, 2002) (Hammer *et al.*, 2002) (Zusman *et al.*, 2002) (Haralalka *et al.*, 2003) (Erickson *et al.*, 2004).

### 1.4.3.2 DksA

DksA es una proteína de 151 aminoácidos y un tamaño de 17 kDa, que se encuentra en muchas bacterias incluyendo *E. coli* y *S. Typhimurium*. Es una proteína que contiene básicamente estructuras de  $\alpha$ -hélice, y se puede dividir en tres regiones estructuralmente diferentes: un dominio globular formado por un dedo de zinc y las regiones N-terminal y C-terminal; un dominio central consistente en dos  $\alpha$ -hélices, que forman un extenso dominio “*coiled coil*”, unidas por un conector; y el tercer dominio corresponde a una  $\alpha$ -hélice del extremo C-terminal (Figura 1.10). Fue inicialmente descrita como un supresor del fenotipo de crecimiento y filamentación de los mutantes *dnaK* al ser sobreexpresada (Kang & Craig, 1990). Desde entonces se ha relacionado la proteína DksA con multitud de procesos celulares tales como división celular, respuesta estricta, *quorum sensing* o virulencia, tanto en *E. coli* como en otras proteobacterias relacionadas (Paul *et al.*, 2004).



**Figura 1.10** Estructura tridimensional de la proteína DksA. Modificado de (Perederina *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que DksA potencia el efecto represor de ppGpp sobre los promotores de los ARNr y su efecto estimulador sobre los promotores de los operones de algunos genes responsables de la síntesis de aminoácidos, sugiriendo que ppGpp y DksA son cofactores (Paul *et al.*, 2004). Además, se ha

determinado que DksA se une al centro catalítico de la ARNpol junto con ppGpp (Perederina *et al.*, 2004). ppGpp y DksA conjuntamente reprimen y/o estimulan directamente la transcripción al causar alteraciones en la formación del complejo abierto (inicio de transcripción). Además se ha propuesto que ppGpp junto con DksA pueden afectar la expresión de otros muchos genes al afectar la afinidad de la ARNpol por la interacción con subunidades sigma alternativas como  $\sigma^s$  y  $\sigma^{54}$  (Gourse *et al.*, 2006) (Magnusson *et al.*, 2005). Un estudio más reciente demostró que DksA y ppGpp no desestabilizan los complejos de elongación, ni inhiben el retroceso de la ARNpol. Además demuestran que DksA y ppGpp incrementan la fidelidad de la transcripción al disminuir la tasa de incorporación incorrecta de nucleótidos (Roghanian *et al.*, 2015).

Se ha sugerido que el dedo de zinc de DksA puede servir como un interruptor de tiol al detectar estrés oxidativo, lo cual puede sugerir la razón por la cual mutantes *dksA* en *S. Typhimurium* están atenuados en modelos de invasión en ratones (Magnusson *et al.*, 2005); (Henard & Vázquez-Torres 2012). Además de *Salmonella*, DksA también se encuentra regulando la virulencia en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, y se ha descrito una proteína similar a DksA en *Campylobacter jejuni* (Aberg *et al.*, 2008) (Sharma & Payne, 2006) (Jude *et al.*, 2003) (Yun *et al.*, 2008).

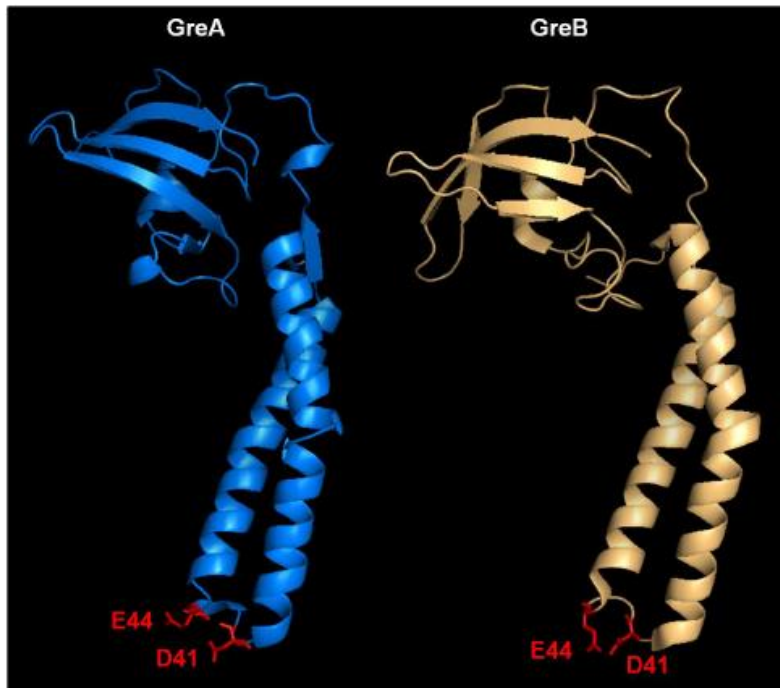
## 1.5 Factores Gre

Los factores Gre promueven la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol cuando esta se encuentra en un estado de pausa por retroceso. La ARNpol corta la cadena de ARN naciente mal posicionada en el extremo 3', dejando un nuevo extremo apropiadamente posicionado en el centro activo de la ARNpol, asegurando así la fidelidad de la transcripción (Borukhov *et al.*, 1993) (Erie *et al.*, 1993).

Los factores Gre se encuentran ampliamente extendidos en procariotas. *E. coli*, como las enterobacterias en general, presenta dos proteínas, GreA y GreB que interaccionan con el canal secundario de la ARNpol suprimiendo las situaciones de pausa (Laptenko *et al.*, 2003). Aunque la homología entre los diferentes

factores Gre en bacterias es muy variable, oscilando entre 21 % y 95 %, todas ellas muestran características en común. Presentan una elevada similitud estructural, un tamaño similar de aproximadamente 158 aminoácidos, un peso molecular de aproximadamente 17 kDa, así como ciertos residuos que se encuentran altamente conservados en las proteínas GreA (Arg<sup>37</sup> y Arg<sup>52</sup>) y GreB (Lys<sup>52</sup>, Lys<sup>53</sup>, Arg<sup>56</sup>, Arg<sup>60</sup> y Lys<sup>67</sup>) (Kulich *et al.*, 2000).

Los factores Gre de *E. coli*, presentan dos dominios estructuralmente bien definidos, un dominio N-terminal compuesto de dos  $\alpha$ -hélices y un dominio globular en el extremo C-terminal. Ambos dominios están unidos por un interdominio flexible (Sparkowski & Das, 1990) (Stebbins *et al.*, 1995) (Figura 1.11).



**Figura 1.11** Estructura de los factores Gre de *E. coli*. Se indican los residuos E44 y D41. Código de acceso en Genbank: GreA (AIZ89807), GreB (AIZ89591). Tomado de (Fernández-Coll, 2015).

Se proponen tres funciones principales para los factores Gre en el proceso de transcripción (Laptenko *et al.*, 2003):

1. Facilitar que la ARNpol escape del promotor, reduciendo la transcripción abortiva.
2. Suprimir el estado de pausa en el que la ARNpol puede entrar en la elongación del transcrito.

### 3. Favorecer la actividad correctora de la ARNpol.

La proteína GreA (del inglés *growth regulator*), fue descrita inicialmente como un supresor del efecto negativo en el crecimiento a altas temperaturas producido por la mutación S522F en la subunidad  $\beta$  de la ARNpol en *E. coli* (Sparkowski & Das, 1990). También se ha descrito que los mutantes carentes de GreA y GreB, no son capaces de crecer a altas temperaturas (42 °C) (Trautinger & Lloyd, 2002), sugiriendo que estos factores son esenciales en el proceso de transcripción en estas condiciones, debido a su capacidad de eliminar eficientemente pausas durante la transcripción.

GreA y GreB aparentemente presentan una actividad similar, ya que se ha observado que en ausencia de un factor éste puede ser sustituido por el otro. No obstante, el procesamiento inducido por ambas proteínas es diferente. GreA induce una actividad endorribonucleotídica generando di y tri-nucleótidos, mientras que GreB estimula la acumulación de productos con un rango mucho más amplio (2-18 nucleótidos) (Borukhov *et al.*, 1993) (Kulish *et al.*, 2000). Muchos estudios se han basado en determinar el efecto de los factores Gre en la fisiología celular. Estos análisis han demostrado que el efecto de la mutación *greB* es menos evidente que el de la mutación *greA*. En las condiciones ensayadas, los mutantes *greB* no muestran fenotipos respecto a la célula salvaje, mientras que los mutantes *greA* presentan diferencias en el crecimiento, la sensibilidad a sales y a iones metálicos divalentes como  $Zn^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  (Susa *et al.*, 2006).

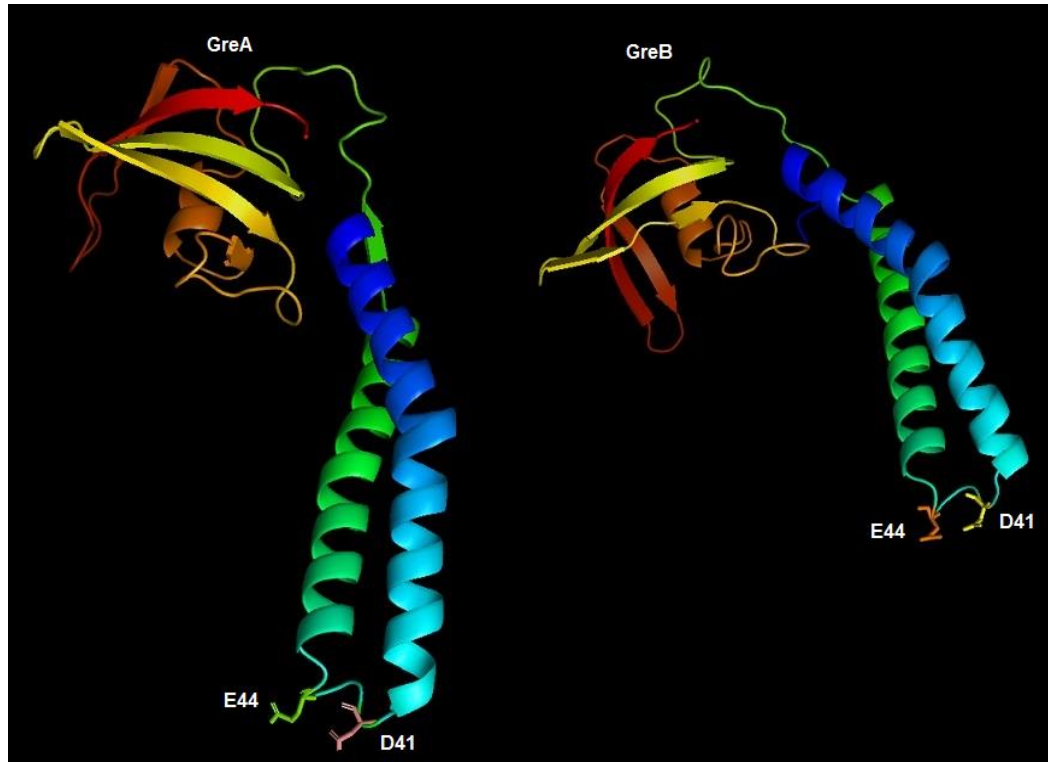
Recientes análisis de microarrays en la cepa MG1655 de *E. coli*, mostraron que GreA activa el inicio de transcripción de 19 genes, involucrados en la síntesis de proteínas ribosomales, asociados a respiración celular y metabolismo, en condiciones normales de crecimiento. El número de genes estimulados por GreA incrementa de forma importante cuando se determinó el efecto de la sobreexpresión de GreA (Stepanova *et al.*, 2007). A GreA también se le podría atribuir un papel a nivel post transcripcional, ya que participa en la estabilidad de proteínas al presentar actividad chaperona, al tener capacidad de suprimir la agregación inducida por calor de proteínas y de promover la reactivación de

proteínas desnaturalizadas en *E. coli*. Además, la sobreexpresión de GreA permite a la célula sobrevivir durante shock térmico y estrés oxidativo (Li *et al.*, 2012).

El extremo N-terminal de los factores Gre es el responsable de la inducción de la actividad endonucleotídica específica de la ARNpol, mientras que el extremo C-terminal es el responsable de la alta afinidad de unión con la ARNpol. El dominio N-terminal de los factores Gre contiene dos residuos, D41 y E44, que interaccionan directamente con el ion  $Mg^{+2}$  del centro catalítico y se han descrito como los responsables de la actividad antipausa de los factores Gre (Opalka *et al.*, 2003) (Laptenko *et al.*, 2003). Se ha propuesto que en la resolución de los complejos parados de la ARNpol, el dominio N-terminal se introduce en el interior del canal secundario, entrando estos residuos en contacto con el centro catalítico y estimulando la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol (Laptenko *et al.*, 2003) (Opalka *et al.*, 2003) (Sosunov *et al.*, 2003). En ausencia de los factores Gre, la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol es catalizada por un dominio flexible localizado en el canal secundario de la ARNpol denominado *Trigger Loop* (TL) y los dos iones metálicos del centro activo (Yuzenkova & Zenkin, 2010). Sin embargo, cuando los factores Gre se unen al canal secundario de la ARNpol desplazan el TL del centro activo. Esta sustitución detiene la hidrólisis mediada por el enlace fosfodiéster dependiente de TL, facilitando la eficiencia de la hidrólisis dependiente de los factores Gre (Roghianian *et al.*, 2011). Ensayos de transcripción *in vitro* han mostrado que los complejos parados de la transcripción se pueden presentar cuando nucleótidos que han sido mal incorporados rompen el híbrido ARN-ADN (Nudler *et al.*, 1997) (Shaevitz *et al.*, 2003). Mediante la activación de la actividad endorribonucleotídica y la consecuente liberación de los nucleótidos mal incorporados, los factores Gre contribuirían en la fidelidad de la transcripción (Fish & Kane, 2002) (Zenkin *et al.*, 2006)

En la figura 1.12 se puede observar la estructura de las proteínas GreA y GreB de *Salmonella*, objeto de estudio de esta tesis doctoral. La predicción de las estructuras fue realizada con el software Swiss Model y Pymol V 1.7.4.4. En la

figura se indican los residuos D41 y E44 en el dominio N-terminal, requeridos para su actividad. El porcentaje de identidad y similitud entre GreA y GreB de *Salmonella* es de 33,75 % y 49,68 %, respectivamente.



**Figura 1.12** Estructura de los factores Gre de *Salmonella*. Se indican los residuos E44 y D41 del dominio N-terminal. La predicción de las estructuras fue realizada con el software SwissModel y Pymol V1.7.4.4. Código de acceso en Genbank: GreA (CBW19367), GreB (CBW19565).

Las bacterias *Thermus thermophilus* y *T. aquaticus* contienen una proteína homóloga a GreA, con la misma función de estimular el corte de los transcritos. Además, presentan la proteína Gfh1 de estructura muy similar a GreA, con capacidad de interactuar con el canal secundario de la ARNpol, pero que, al contrario que GreA, inhibe la actividad endonucleolítica de la ARNpol (Lamour *et al.*, 2006) (Laptenko *et al.*, 2006) (Symersky *et al.*, 2006). Interesantemente, la actividad de Gfh1 varía con el pH, al causar éste una alternancia conformacional entre una forma activa capaz de unirse a la ARNpol, similar a GreA, y una forma inactiva. Esta conformación inactiva es debida a un giro de 170° entre los dominios N- y C- terminal de la proteína (Laptenko *et al.*, 2006).



*M. tuberculosis* presenta una proteína denominada Rv3788, homóloga a los factores Gre que, aunque se une al canal secundario de la ARNpol, al igual que Gfh1 no estimula la actividad endonucleotídica. Esta proteína modula el centro catalítico de la ARNpol, afecta la acción de ppGpp sobre la transcripción y anula la acción de los factores Gre (China *et al.*, 2011)(China *et al.*, 2012).

Los factores Gre de otros microorganismos han sido caracterizados en mayor o menor medida. En *Bacillus subtilis*, se ha sugerido que la proteína GreA está constantemente asociada al centro catalítico de la ARNpol durante el inicio y la elongación de la transcripción resolviendo pausas generadas durante la elongación (Kusuya *et al.*, 2011). En *Streptococcus pneumoniae* se ha descrito un unico factor Gre, GreA<sub>spn</sub> que contiene los dos residuos conservados en todos los factores Gre (D41 y E44) requeridos para su actividad, que le permite prevenir las largas pausas las cuales causan atascos y obstáculos para la óptima expresión génica (Hoskins *et al.*, 2001) (Lanie *et al.*, 2007) (Yuzenkova *et al.*, 2014). En *Wolbachia*, se ha caracterizado recientemente GreA, como el factor de elongación de la transcripción (Nag *et al.*, 2014). Y por último, en *Rhizobium tropici* y *Sinorhizobium meliloti* los factores Gre son importantes en la osmotolerancia (Nogales *et al.*, 2002). En *Salmonella*, hasta ahora no se ha descrito ningún estudio sobre los factores Gre y el impacto de estos en la fisiología

A parte de los factores Gre y DksA, existen también otras proteínas reguladoras que actúan por interacción con la ARNpol a través del canal secundario, como por ejemplo Rnk y TraR. La secuencia aminoterminal de Rnk tiene una gran similitud con la secuencia de los factores Gre y Gfh1, y se ha demostrado su capacidad de unión con la ARNpol *in vitro*, sugiriendo una posible actividad anti-Gre (Lamour *et al.*, 2008). TraR es un proteína homóloga a DksA codificada en el plásmido conjugativo F de *E. coli*, la cual puede realizar alguno de los papeles de DksA (Blankschien *et al.*, 2009). La existencia de todos estos factores con capacidad de interaccionar con el canal secundario de la ARNpol sugiere que pueden producirse fenómenos de competencia para unirse con la ARNpol. Existen evidencias de que este tipo de interacciones podrían tener importantes

consecuencias reguladoras. Así, Potrykus *et al.*, (2006) han demostrado que DksA y GreA tienen efectos antagónicos sobre la transcripción del promotor *rrnB* P1 tanto *in vivo* como *in vitro*. Mientras DksA, junto con ppGpp, inhiben la transcripción desde este promotor, GreA la activa. Por el contrario, se ha visto que GreB es capaz de suplir la falta de DksA *in vitro* en la regulación de la expresión de este promotor (Rutherford *et al.*, 2007). Nuestro grupo de investigación ha descrito cómo la expresión de las fimbrias de tipo 1 se encuentra regulada por ppGpp y DksA. *In vivo*, la falta de ppGpp provoca una represión de la expresión de estas fimbrias, mientras que la falta de DksA provoca una sobreexpresión. Este aumento de la expresión se debe a una mayor asociación, en ausencia de DksA, de los factores Gre con la ARNpol (Aberg *et al.*, 2008).

En *E. coli*, la competencia de estos factores por la unión a la ARNpol estaría modulada por la cantidad de cada factor presente en la célula así como por la afinidad relativa de cada uno de ellos por el canal secundario de la ARNpol. Se ha descrito que la concentración de DksA y los factores Gre son relativamente constantes a lo largo de la curva de crecimiento, encontrándose DksA en concentraciones más elevadas que los factores Gre, siendo GreB la proteína menos abundante (Rutherford *et al.*, 2007). Además, la afinidad relativa de las diferentes proteínas por la ARNpol es diferente. Mientras DksA y GreB tienen una afinidad similar, GreA es menos afín. Por lo tanto, cabe pensar que la mayoría de ARNpol debe encontrarse formando complejo con DksA. La posibilidad de que algún factor ambiental o fisiológico, al igual que sucede con el pH en el caso de Gfh1, pueda cambiar sustancialmente la afinidad de alguna de las proteínas por la ARNpol podría modificar el escenario sugerido. En este sentido se ha descrito que DksA ejerce una regulación alostérica sobre el complejo ARNpol-ADN en los promotores de los genes del ARNr (Rutherford *et al.*, 2009). Este hallazgo abre las puertas a la posibilidad de que la secuencia de ADN o el factor  $\sigma$  unido en ese momento a la ARNpol también le provoquen cambios conformacionales que hagan variar la afinidad del canal secundario por unir uno u otro factor regulador.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Como se indica en la introducción, no se han publicado estudios sobre los factores Gre en *Salmonella*. El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral fue estudiar el papel de los factores Gre en la fisiología y patogenicidad de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). Para llevar a cabo este estudio, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción de mutantes en la cepa SV5015 de *S. Typhimurium* mediante reemplazamiento alélico de los genes *greA* y *greB*.
2. Analizar el impacto de los factores Gre en la fisiología de *Salmonella*, por medio de estudios fenotípicos: ensayos de citotoxicidad, motilidad, resistencia al estrés oxidativo y formación de biofilm.
3. Analizar el papel de los factores Gre en la patogenicidad de *Salmonella*, por medio del estudio de la regulación de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2.
4. Realizar estudios transcriptómicos (Microarrays) para evaluar el impacto de los factores Gre en la expresión génica de *Salmonella*.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Durante la realización de esta tesis doctoral se utilizaron las cepas bacterianas especificadas en la siguiente tabla.

**Tabla 3.1** Cepas utilizadas en este trabajo

CEPAS	GENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA U ORIGEN
SV5015	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL1344 <i>his</i> <sup>+</sup>	(Vivero <i>et al.</i> , 2008)
TGC-1	SV5015 <i>greA</i>	Este estudio
TGC-2	SV5015 <i>greB</i>	Este estudio
TGC-3	SV5015 <i>greAgreB</i>	Este estudio
TYLL-1	SV5015 <i>greA::lacZ</i>	Este estudio
TYLL-2	SV5015 <i>greB::lacZ</i>	Este estudio
CRIS-1	SV5015 <i>hilA::km</i>	Este estudio
MHQ-2	SV5015 <i>hilC</i>	Dr. M. Hüttener
MHQ-3	SV5015 <i>hilD</i>	Dr. M. Hüttener
TGC-4	SV5015 <i>hilD::cm</i>	Este estudio
TGC-5	SV5015 <i>hilE::cm</i>	Este estudio
TGC-6	SV5015 <i>rtsA::cm</i>	Este estudio
SV5015UB2	SV5015 <i>hilA::lacZ</i>	(Baños <i>et al.</i> , 2009)
TGC-7	SV5015 <i>hilA::lacZ greAgreB</i>	Este estudio
TGC-8	SV5015 <i>hilA::lacZ hilC</i>	Este estudio
TGC-9	SV5015 <i>hilA::lacZ hilC greAgreB</i>	Este estudio
TGC-10	SV5015 <i>hilA::lacZ hilD::cm</i>	Este estudio
TGC-11	SV5015 <i>hilA::lacZ hilD::cm greAgreB</i>	Este estudio
TGC-12	SV5015 <i>hilA::lacZ hilE::cm</i>	Este estudio
TGC-13	SV5015 <i>hilA::lacZ hilE::cm greAgreB</i>	Este estudio
TGC-14	SV5015 <i>hilA::lacZ rtsA::cm</i>	Este estudio
TGC-15	SV5015 <i>hilA::lacZ rtsA::cm greAgreB</i>	Este estudio
TGC-219	SV5015 <i>hilC::lacZ</i>	Este estudio
TGC-57	SV5015 <i>hilC::lacZ greAgreB</i>	Este estudio
TGC-58	SV5015 <i>rtsA::lacZ</i>	Este estudio
TGC-59	SV5015 <i>rtsA::lacZ greAgreB</i>	Este estudio
MHS-2	SV5015 <i>sipA::3Flag</i>	(Hüttener <i>et al.</i> , 2014)
TGC-16	SV5015 <i>sipA::3Flag greAgreB</i>	Este estudio

## Materiales y métodos

---

JPTM7	SV5015 <i>hilA</i> ::3Flag	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
TGC-17	SV5015 <i>hilA</i> ::3Flag <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-18	SV5015 <i>hilA</i> ::3Flag <i>hilD</i> :: <i>cm</i>	Este estudio
TGC-19	SV5015 <i>hilA</i> ::3Flag <i>greAgreB hilD</i> :: <i>cm</i>	Este estudio
TGC-20	SV5015 <i>invF</i> ::3Flag	Este estudio
TGC-21	SV5015 <i>invF</i> ::3Flag <i>greAgreB</i>	Este estudio
JPTM8	SV5015 <i>ssrA</i> ::3Flag	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
TGC-22	SV5015 <i>ssrA</i> ::3Flag <i>hilD</i> :: <i>cm</i>	Este estudio
TGC-23	SV5015 <i>ssrA</i> ::3Flag <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-24	SV5015 <i>ssrA</i> ::3Flag <i>greAgreB hilD</i> :: <i>cm</i>	Este estudio
TGC-25	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+76)	Este estudio
TGC-26	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+76) <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-29	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+624)	Este estudio
TGC-30	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+624) <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-31	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+804)	Este estudio
TGC-32	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+804) <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-33	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+1044)	Este estudio
TGC-34	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+1044) <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-35	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+1235)	Este estudio
TGC-36	SV5015 <i>hilD</i> :: <i>lacZ</i> (+1235) <i>greAgreB</i>	Este estudio
SV6190	<i>hilD</i> $\Delta$ 3'UTR:: <i>km</i>	(López-Garrido <i>et al.</i> , 2014)
TGC-53	SV5015 <i>hilD</i> $\Delta$ 3'UTR	Este estudio
TGC-37	SV5015 <i>hilD</i> $\Delta$ 3'UTR <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-38	SV5015 <i>hilD</i> $\Delta$ 3'UTR:: <i>lacZ</i> (+965)	Este estudio
TGC-39	SV5015 <i>hilD</i> $\Delta$ 3'UTR:: <i>lacZ</i> (+965) <i>greAgreB</i>	Este estudio
SV5293	14028 <i>sipC</i> :: <i>lacZ</i>	(López-Garrido & Casadesús, 2010)
TGC-40	SV5015 <i>sipC</i> :: <i>lacZ</i>	Este estudio
TGC-41	SV5015 <i>sipC</i> :: <i>lacZ greAgreB</i>	Este estudio
TGC-54	SV5015 <i>sipC</i> :: <i>lacZ hilD</i> $\Delta$ 3'UTR	Este estudio
TGC-55	SV5015 <i>sipC</i> :: <i>lacZ hilD</i> $\Delta$ 3'UTR <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-42	SV5015 <i>motA</i>	Este estudio
UMR1	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028-1s NarI <sup>R</sup>	(Römling <i>et al.</i> , 1998a)
MAE46	UMR1 <i>ompR101</i> :: <i>ap</i>	(Römling <i>et al.</i> , 1998b)
MAE50	UMR1 <i>csgD101</i>	(Römling <i>et al.</i> , 2000)
TGC-60	UMR1 <i>csgD101 greAgreB</i>	Este estudio
TGC-43	UMR1 <i>greA</i> :: <i>km</i>	Este estudio
TGC-44	UMR1 <i>greB</i> :: <i>km</i>	Este estudio
TGC-45	UMR1 <i>greAgreB</i>	Este estudio
TGC-46	UMR1 <i>csgD</i> :: <i>lacZ</i> (+7)	Este estudio

TGC-47	UMR1 <i>csgD::lacZ (+7) greAgreB</i>	Este estudio
TGC-48	UMR1 <i>csgD::lacZ (+147)</i>	Este estudio
TGC-49	UMR1 <i>csgD::lacZ (+147) greAgreB</i>	Este estudio
MAE52	UMR1 <i>PcsgD1</i>	(Römling <i>et al.</i> , 1998b)
TGC-50	UMR1 <i>PcsgD1 greAgreB</i>	Este estudio
WG49	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium WG49, F+	Dra. M. Muniesa
MA6247	SL1344 Gifsy-1 <sup>-</sup> Gifsy-2 <sup>-</sup>	(Figueroa-Bossi & Bossi, 1999)
TT1704	$\Delta his$ -9533	(Torreblanca & Casadesús, 1996)
LB5000	<i>rLT<sup>-</sup> rSA<sup>-</sup> rSB<sup>-</sup></i>	(Bullas & Ryu, 1983)

En la siguiente tabla se especifican los plásmidos y sus características relevantes utilizados en este trabajo.

**Tabla 3.2** Plásmidos utilizados en este trabajo

PLASMIDOS	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
pKD3	<i>bla FRT cm PS1 PS2 oriR6K Cm<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup></i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	<i>bla FRT km PS1 PS2 oriR6K Km<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup></i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	<i>bla P<sub>BAD</sub> gam bet exo pSC101 oriTS Ap<sup>R</sup></i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	<i>bla cm cl857 IP<sub>R</sub> flp pSC101 oriTS Ap<sup>R</sup></i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKG137	<i>cm FRT lacZY+ t<sub>his</sub>, oriR6K.</i>	(Ellermeier <i>et al.</i> , 2002)
pKG136	<i>km FRT lacZY+ t<sub>his</sub>, oriR6K.</i>	(Ellermeier <i>et al.</i> , 2002)
pSUB11	Vector utilizado como molde para generar la etiqueta 3Flag	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pGEM-T easy	rep <sub>pMB1</sub> P <sub>17</sub> P <sub>SP6</sub> Cb <sup>R</sup>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pBAD18	rep <sub>pMB1</sub> p <sub>araBAD</sub> Cb <sup>R</sup>	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBADHiIA	pBAD18+ <i>hilA</i> <sub>SV5015</sub>	(Hüttener <i>et al.</i> , 2014)
pBADHiID	pBAD18+ <i>hilD</i> <sub>SV5015</sub>	M. Hüttener
pBAD30	rep <sub>15A</sub> p <sub>araBAD</sub> Ap <sup>R</sup>	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pWJB30	pBAD30+ <i>adrA</i> <sub>UMR1</sub>	(Zogaj <i>et al.</i> , 2001)
pBR322	Vector de clonaje, ori <sub>pMB1</sub> , Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
pBR <i>greA</i>	pBR322+ <i>greA</i> <sub>SV5015</sub> con su promotor	Este estudio
pBR <i>greB</i>	pBR322+ <i>greB</i> <sub>SV5015</sub> con su promotor	Este estudio

pBR <i>greAB</i>	pBR322+ <i>greAgreB</i> <sub>SV5015</sub>	Este estudio
pHM1883	origen pGB2, vector de expresión Ptrc, Spec <sup>R</sup>	(Vinella <i>et al.</i> , 2012)
pHM1873	origen pGB2, <i>greA</i> bajo el control de Ptrc, Spec <sup>R</sup>	(Vinella <i>et al.</i> , 2012)
pHM1854	origen pGB2, <i>greA</i> D41A E44Y bajo el control de Ptrc, Spec <sup>R</sup>	(Vinella <i>et al.</i> , 2012)
pQF50	Gen <i>lacZ</i> sin promotor, RO1600/MB1 ori, Ap <sup>R</sup>	(Farinha & Kropinski, 1990) (Gerstel & Römling, 2001)
pUGE11	pQF50 +21/-684 del promotor de <i>csgD</i>	(Gerstel <i>et al.</i> , 2006)
pUGE13	pQF50 +441/-684 del promotor de <i>csgD</i>	(Gerstel <i>et al.</i> , 2006)

---

El bacteriófago utilizado en este trabajo fue el P22 HT *int4* (fago lítico) (Schmieger, 1972).

### 3.2 Medios de cultivo y antibióticos

#### 3.2.1 Medios de cultivo

Se usaron los siguientes medios de cultivo para el crecimiento bacteriano:

**LB (Lennox Broth):** Se usó de forma rutinaria para el cultivo de las bacterias en líquido. Su composición es la siguiente: 5 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de triptona. La composición de NaCl de este medio varió conforme a los ensayos realizados y se detallan en los respectivos apartados.

**LB agar:** tiene la misma composición del medio anterior, pero suplementado con 15 g/l de agar bacteriológico.

**LB agar blando:** este medio semisólido utilizado en la titulación de lisados fágicos. Es LB suplementado con 6 g/l de agar bacteriológico.

**LB agar EBU:** medio de cultivo sólido utilizado para seleccionar clones libres de pseudolisógenos tras el proceso de transducción generalizada con el fago P22. El medio LB agar, una vez esterilizado, se suplementa con los siguientes

componentes: 0,25 % (p/v) de glucosa, 0,25 % (p/v) de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0125 g/l de azul de evans y 0,025 g/l de fluoresceína (Maloy *et al.*, 1996).

**Agar Congo red:** este medio de cultivo se usó para el análisis de la formación del morfotipo rdar. Está compuesto de 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de triptona, 15 g/l de agar bacteriológico, 0,04 g/l de Congo red y 0,02 g/l de azul de Coomassie (Latasa *et al.*, 2012).

**Agar motilidad:** este medio de cultivo se usó en los estudios de motilidad. Está compuesto de LB conteniendo 10 g/l de NaCl y 3 g/l de agar (Ahmad *et al.*, 2013).

**SOB:** Medio de cultivo líquido utilizado para los experimentos de inactivación de genes cromosómicos. Está compuesto de 20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0,58 g/l de NaCl, 0,19 g/l de KCl y 20 mM de MgCl<sub>2</sub> + MgSO<sub>4</sub> (Hanahan *et al.*, 1991).

**SOC:** Medio de cultivo líquido utilizado para la recuperación de las células bacterianas después de la electroporación. Su composición es igual a la de SOB, pero suplementado con 20 mM de glucosa (Hanahan *et al.*, 1991).

### 3.2.2 Antibióticos

Los siguientes antibióticos fueron utilizados cuando fue requerido a las concentraciones indicadas: Kanamicina (Km): 25 µg/ml, 50 µg/ml; Cloramfenicol (Cm): 15 µg/ml; Ampicilina (Ap): 50 µg/ml; Tetraciclina (Tc): 12,5 µg/ml; Espectinomicina (Spec): 50 µg/ml, 25 µg/ml.

## 3.3 Métodos microbiológicos

### 3.3.1 Esterilización

Los medios de cultivo, material de vidrio y algunas de las soluciones utilizadas en este trabajo, fueron esterilizados por calor húmedo y presión en autoclave

durante 20 min a 121 °C. Cuando alguna solución no permitía ser autoclavada, se esterilizó mediante filtros estériles de 0,22 µm de diámetro (Millipore).

### 3.3.2 Mantenimiento de microorganismos

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron mantenidas a -80 °C en glicerol al 20 % (v/v) hasta su uso; y para reconstituirlas fue necesario sembrarlas en LB agar con los respectivos antibióticos. La placa con la cepa correspondiente fue incubada a 30 o 37 °C, según lo requerido por el microorganismo, durante 12-16 horas. Los bacteriófagos se mantuvieron a 4 °C en forma de lisado fágico, con gotas de cloroformo para evitar crecimiento bacteriano.

### 3.3.3 Inoculación y cultivo de microorganismos

Para los estudios de expresión y detección de proteínas, los cultivos fueron inoculados a partir de colonias crecidas en placas durante 16 horas. A partir de la estría se obtuvo una suspensión celular en LB desde la cual se inoculó el medio de cultivo líquido a una  $DO_{600nm}$  (densidad óptica a 600 nm) de 0,001.

Los cultivos líquidos fueron incubados a 37 °C, con una agitación de 200 rpm, utilizando como máximo una quinta parte del volumen total del erlenmeyer. La evolución del crecimiento bacteriano fue estudiada por seguimiento espectrofotométrico de la  $DO_{600nm}$ , con el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis de Thermo Scientific.

## 3.4 Oligonucleótidos

En la siguiente tabla se especifican los oligonucleótidos diseñados en este trabajo suministrados por Sigma-Aldrich.

Tabla 3.3 Oligonucleótidos usados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' a 3')
<b>Inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR</b>	
greAP1	CCCTACAGGAATGTTCAAGAGGTATAACAAATGCAAGCTGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC
greAP2	TACACCAACAATTTGCGTATTGAGTACTGCTTAAAGGTACATATGAATATC CTCCTTAGT
greAP1UP	TGACCCTGGTATGGCATAT
greAP2DOWN	TCTGTGTAACGAGGGGTT
greBP1	CAATATCGACAGCAAAGGTAATCAACGAGATGAAAACGGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC
greBP2	CATCAGCGGGGCTTAGGATTCTTCTTGTCTTATTTGACCATATGAATATC CTCCTTAGT
greBP1UP	CTTAAATATACAATTAATCGGC
greBP2DOWN	AAAATCAGGGGATAGTTATAC
hilDP1+76	ATGGAAAATGTAACCTTTGTAAGTAATAGTCATCAGCGTCTGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
hilDP2.1	TTAATGGTTCCGCAATTTTTATGAATGTGCGATGGCGTAGTTTTTCATATGAATA TCCTCCTTAGT
hilDP1UP	GTAGGATACCAGTAAGGAAC
hilDP2DOWN	GCGTGTTAATGCGCAGTCTG
hilDP1+624	TTTCTGCTGTTCTGCTTACTGCTTTTCTCCGACTCCCGGAGAGTTATGAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilDP1+804	CGGAACTTGCAGAAGAAGGTACCAGCTTAGCGACATCTACTTATCGGC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilDP1+1044	TTTTTATTAATAAATTGTAATAATTTAAATTCAGACTGCGCATTAAACACGCGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilDP1+1235	GATATTGCCTTATTCACATCGTAAGAATTCGTCCAGATGACACTATCTCCG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilDP2.2	TATAAATATGAATAAAATGCCGGCCTTAATCCACAGGGTTAAAGCCGGAA CATATGAATATCCTCCTTAGT
hilEP1	CTGGACGGTATTGAAGGCGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilEP2	AGGCCGCCGTGTTTTGCTTTTCATATGAATATCCTCCTTAGT
hilEP1UP	GGTATACAGAGACACCAACG
hilEP2DOWN	TGGTTACATGAGCGCTCATC
rtsAP1	GCACATTTAATAAAAGGAAATTATCATGCTAAAAGTATTTAATCCCTCACC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
rtsAP2	TCTTATACTGCATTGTGAGATATCTCAATTAACATATTGATGACGAGAGGC ATATGAATATCCTCCTTAGT
rtsAP1UP	GATCGCCACCTGATACCTTA
rtsAP2DOWN	GCGAGCAACAGAATCCCATC
csgDP1+7	ACTTGCTTTAAGATTTGTAATGGCTAGATTGAAAACAGTTAAAAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC



<b>csgDP2</b>	GTA ACTCTGCTGCTACAATCCAGGTCAGATAGCGTTCATGGCCCATATG AATATCCTCCTTAGT
<b>KT</b>	CGGCCACAGTCGATGAATCC
<b>K2</b>	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
<b>C1</b>	CCTTGTCGCCTTGCGTATAA
<b>C2</b>	CCTACCTGTGACGGAAGATC
<b>LACZR</b>	GATGACCTGCAAGGCGATTA

**Fusiones génicas con la secuencia codificante para 3Flag**

<b>InvFP13Flag</b>	GCCGCGGAAATTATCAAATATTATTCAATTGGCAGACAAAGACTACAAAGA CCATGACGG
<b>InvFP23Flag</b>	GCGGCACATGCCAGCACTCTGGCCAAAAGAATATGTGTCTCATATGAATA TCCTCCTTAG
<b>InvFP13FlagUP</b>	GCGTATGGCGCAATCGCTGC
<b>InvFP23FlagDOWN</b>	CCCACTTCCCGTTACAGG

**Clonaje factores Gre**

<b>greASalmUP</b>	<u>GAATTC</u> TCGCGCTAACACCCTGG
<b>greASalmDOWN</b>	<u>GGATCC</u> TCGCTGCCGCGTTAAGG
<b>greBSalmUP</b>	<u>GAATTC</u> GTAAGTCCCAAAGGTTTCGC
<b>greBSalmDOWN</b>	<u>GGATCC</u> ATGGGTTAGCTTCGTC
<b>greAsallUP</b>	GGGG <u>TCGAC</u> GGAAGTCCAGGGTAAAATGG
<b>greABamHIDOWN</b>	GGGG <u>GATCCT</u> TCGCTGCCGCGTTAAGG
<b>pBR-FW</b>	CCATTATTATCATGAACATTAAC
<b>pBR-RV</b>	GATGCCGCGCCACGATGCGTCC

\*Sitios de restricción subrayados

**PCR cuantitativa en tiempo real**

<b>hilDRTFW</b>	GCCAGAAGAG AGGTATTTG
<b>hilDqPCRRV</b>	CAGTAAGCAGGAACAGCAG
<b>hilAqPCR1</b>	GGATATTCTTGAGCTCATGG
<b>hilAqPCR2</b>	GAGAAGCGGGTTGGTGTTT
<b>hilCqPCR1</b>	CTCACCCGCAAATGGTCAC
<b>hilCqPCR2</b>	GCCTGATTCATACGAGCATC
<b>ssrAqPCR1</b>	GCTCAATCTCAAGAATACGC
<b>ssrAqPCR2</b>	CTGCCGTTTCTGAACCATTG
<b>rtsART-FW</b>	GTATATTACGGCATCAGGGC
<b>rtsART-RV</b>	GCCTGTTTCTATTGGCGC
<b>qCsgD ffw</b>	ACGCTACTGAAGACCAGGAAC
<b>qCsgD rev</b>	GCATTGCGCCACGCAGAATA
<b>GAPDHqPCR1</b>	GTCCGTCTAAAGACAACACC
<b>GAPDHqPCR2</b>	CATCAGACCTTCGATGATGC
<b>qrecAFFW</b>	GGCGAAATCGGCGACTCT
<b>qrecAREV</b>	CATACGGATCTGGTTGATGAAAATC

---

	<b>RT-PCR</b>
<b>sipAFor</b>	GAACGGTGTGGAGGTATCTG
<b>sipARev</b>	GAGAATGTTAAAACCGATACC
<b>sseAFor</b>	GGGCTAAGGTGAGTCAACAG
<b>sseARev</b>	CTTGAGCATTAAAGTTGTTTCAG
<b>pduAFor</b>	GTCTGACCATAGCGCCTGAC
<b>pduARev</b>	GATGCGCAGCTTAAAACCAC
<b>prpCFor</b>	CGGATTACCCGCCAATGTCC
<b>prpCRev</b>	CAGCAGATGCAGGAAATGGC
<b>putAFor</b>	GTCTGACCATAGCGCCTGAC
<b>putARev</b>	GATGCGCAGCTTAAAACCAC
<b>sall16S</b>	CTACTGGAAACGGTGGCTAA
<b>sall116S</b>	AAGCCTGCCAGTTTCGAATG

---

### **3.5 Técnicas experimentales con ADN**

#### **3.5.1 Aislamiento de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico fue aislado usando el kit QIAprep Spin Miniprep, de la casa comercial QIAGEN, siguiendo las indicaciones del fabricante. El aislamiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas seguido de la adsorción del ADN sobre una columna de sílica en presencia de altas concentraciones de sal. El procedimiento consiste en tres pasos básicos: 1) preparación y aclarado del lisado bacteriano, 2) adsorción del ADN sobre la matriz, 3) lavado y elución del ADN plasmídico.

#### **3.5.2 Utilización de enzimas de restricción y ligación**

En el tratamiento del ADN con enzimas de restricción (Promega y Fermentas) o el enzima ligasa del fago T4 (Promega) se siguieron las instrucciones suministradas por los fabricantes.

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

De acuerdo a la finalidad del uso de ADN amplificado mediante PCR, se utilizaron diferentes productos comerciales:

- Cuando se requirió una elevada fidelidad en la amplificación, como en el caso de la generación de un fragmento de PCR para reemplazamiento alélico o el clonaje de algún gen específico, se utilizó la ADN polimerasa termoestable Accuzyme (Bioline). Las reacciones con un volumen final de 25  $\mu$ l contenían: 18  $\mu$ l de agua destilada, 2,5  $\mu$ l de tampón de amplificación 10X, 1  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos trifosfato (dNTP) 10 mM de cada tipo, 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de muestra y 0,5  $\mu$ l de enzima.

- Cuando la finalidad de la amplificación por PCR era realizar un genotipado de la cepa bacteriana (detección del fragmento amplificado), se utilizó el enzima *Taq* polimerasa de Thermo Scientific, presente en una solución concentrada 2X que incluye todos los componentes necesarios para la PCR excepto el ADN molde y los oligonucleótidos. Cada reacción con un volumen final de 25  $\mu$ l contenía: 9,5  $\mu$ l de agua destilada, 12,5  $\mu$ l de solución 2X, 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ l de muestra.

La preparación de las muestras a amplificar consistió en resuspender una colonia bacteriana en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril y usar 1  $\mu$ l de esta suspensión para cada reacción. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo un programa básico, en el cual la temperatura y tiempo de hibridación junto con el tiempo de extensión variaban en función de la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y del tamaño del fragmento a amplificar. El programa básico utilizado fue: 1- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 5 min, 2- Desnaturalización 95 °C durante 30 s, 3- hibridación 55 °C durante 30 s, 4- Extensión 72 °C durante 1 min y 30 s (Pasos 2, 3 y 4 se repitieron 25 veces), 5- Extensión final 72 °C durante 10 min.

### 3.5.4 Secuenciación de fragmentos de ADN

El ADN se secuenció por el método de Sanger, basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos, mediante una reacción de PCR. Para secuenciar fragmentos de ADN de forma rutinaria se utilizó el kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems, siguiendo las indicaciones del fabricante. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 1- Desnaturalización inicial: 96 °C durante 1 min, 2- Desnaturalización 96 °C durante 10 s, 3- Hibridación 50 °C durante 5 s, 4- Extensión 60 °C durante 4 min (pasos 2, 3 y 4 se repitieron 25 veces). Las muestras fueron analizadas en el secuenciador ABI Prism 3700 de Applied Biosystems, en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

### 3.5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

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

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

Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió 1/5 parte de tampón de muestra (0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xilen cianol, 60 % glicerol, 10mM Tris, 1mM EDTA). Conjuntamente con las muestras a analizar, se cargaron marcadores de pesos moleculares que permitieron estimar el tamaño de las moléculas de ADN presentes en las muestras. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron:

- DNA/  $\lambda$ HindIII (Fermentas) para analizar ADN plasmídico.
- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) para analizar fragmentos de hasta 10 kilobases (kb).
- Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas) para analizar fragmentos de hasta 1 kb.

Todas las electroforesis de ADN realizadas en este trabajo se llevaron a cabo en cubetas Mupid®EXu/One. Tras cargar las muestras en los pocillos se aplicaba un voltaje de 100-135 V. El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (Sigma) durante 15-20 min. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó el equipo Gel Doc™ XR system con el software Image Lab™.

### **3.5.6 Aislamiento de fragmentos de ADN**

Para el aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa, tras la electroforesis y la tinción con bromuro de etidio, el fragmento se visualizó con una lámpara de luz UV. A continuación se recortó el trozo de gel que contenía el fragmento de interés. De manera rutinaria, los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction de QIAGEN, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

## **3.6 Técnicas experimentales con ARN**

### **3.6.1 Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir del sedimento proveniente de 1 ml de cultivos crecidos en agitación de 200 rpm en LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 (fase estacionaria). En todos los casos se aisló ARN total de 3 cultivos independientes de cada cepa.

La extracción de ARN total para llevar a cabo los ensayos de transcriptómica (Microarrays) y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se llevó a cabo con el kit

SV Total ARN Isolation System de Promega, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Una vez obtenido el ARN total, se sometió a un tratamiento con una DNAsa comercial (DNAsa Turbo de Ambion) a 37 °C por 30 min con el fin de eliminar posible contaminación con ADN genómico. El ARN aislado para los ensayos de microarrays, se sometió a una purificación y concentración con el kit RNeasy MinElute Cleanup de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6.1.1 Cuantificación del ARN total purificado

La cuantificación del ARN total se llevó a cabo mediante la determinación de la  $DO_{260nm}$  con el espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000. Las muestras de ARN total se analizaron mediante el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) en la Plataforma de Transcriptómica del Parque Científico de Barcelona que, además de cuantificar, permite determinar la integridad (calidad) del ARN purificado.

### 3.6.2 Microarrays

Para estos análisis se utilizó el ARN total aislado como se describe en el apartado 3.6.1.

El análisis transcriptómico se llevó a cabo utilizando *custom arrays* de ADN de la cepa de *Salmonella* Typhimurium SL1344, fabricados por NimbleGen y se realizaron en la Plataforma de Genómica Funcional del Institut de Recerca Biomèdica (IRB, Barcelona). Estos microarrays contenían 4941 sondas de la secuencia genómica de la cepa SL1344 (4519 del cromosoma de SL1344 (NC\_016810) y 103, 99, 14 y 206 de los plásmidos pSLT (AE006471), pCol1B9 (HE654725), pRSF1010 (HE654726) y R27 (AF250878), respectivamente). La detección de cada ORF se realizó mediante hibridación a 7 sondas independientes y se llevó a cabo por duplicado. Se debe indicar que las cepas utilizadas no contenían el plásmido conjugativo R27 y, por tanto, no se muestra ningún resultado con las correspondientes sondas. A partir de 25 ng de ARN total

se obtuvieron las librerías de ADNc (ADN complementario) utilizando el kit WTA2 (Sigma) y realizando 17 ciclos de amplificación. El marcaje, hibridación y lavado se realizaron siguiendo las indicaciones de Roche NimbleGen (NimbleGen arrays users guide v6.0). Para cada muestra, se marcó 1 µg de ADNc con oligonucleótidos marcados con nonúmeros de Cy3 y polimerización Klenow. La hibridación de las muestras (2 µg de ADNc-Cy3) con el array se realizó durante 18 horas a 42 °C (Hybridization System 4, NimbleGen). A continuación, los arrays se lavaron y se escanearon (MS 200 Microarray Scanner, Roche NimbleGen). El archivo de los datos en bruto se obtuvo a partir de imágenes, utilizando el software NimbleGen Scan v2.6 (Roche NimbleGen). El análisis bioinformático de los datos obtenidos fue realizado por Evarist Planet (IRB, Barcelona). Para la corrección, normalización y resumen de los datos, previo al análisis, se utilizó el algoritmo RMA (Irizarry *et al.*, 2003). Para realizar las comparaciones entre muestras se utilizó la prueba t-test moderada (Smyth, 2004). Se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados seleccionando aquellos con un P valor Benjamini-Yekutielli ajustado menor a 0,05.

### **3.6.3 Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

La técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real permitió monitorizar el proceso de amplificación del ADNc obtenido tras una reacción de retrotranscripción del ARNm (ARN mensajero) de los genes a analizar, para posteriormente realizar una cuantificación de la abundancia relativa de los diferentes ARNm entre las diferentes cepas.

#### **3.6.3.1 qPCR utilizando SYBR<sup>®</sup>GREEN. Condiciones de reacción**

Para los ensayos de retrotranscripción del ARN al ADNc, se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) que contiene oligonucleótidos aleatorios para amplificar el ARN de manera inespecífica, dNTPs, una transcriptasa reversa MultiScribe<sup>™</sup>, y MgCl<sub>2</sub>. Para cada reacción se utilizó 1 µg de ARN total en un volumen final de 20 µl, indicada por el fabricante. Como control negativo se realizaron reacciones iguales para cada muestra de

ARN pero sin la transcriptasa reversa; y se utilizaron entre 2 y 3 muestras de ARN por cepa. Todos los ensayos de retrotranscripción se llevaron a cabo en un Termociclador Biorad T100 Thermal Cycler. El programa utilizado fue el indicado por el fabricante: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min y 85 °C por 5 min.

El kit SYBR® Green PCR Master Mix X2 (Life Technologies) se utilizó para llevar a cabo las reacciones de cuantificación del ADNc obtenido previamente. Este kit contiene el colorante SYBR® Green I, una ADN Polimerasa AmpliTaq Gold®, dNTPs con dUTP, y los respectivos tampones. Para cada reacción con volumen final de 20 µl, se utilizaron 10 µl del SYBR® Green PCR Master Mix X2, 1 µl de cada oligonucleótido específicos para el gen diana a una concentración final de 300 nM y 8 µl de ADNc en una dilución 1:100. Como control interno de cada ensayo se usó el gen *gapA* que es un gen “housekeeping” que codifica para la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) que muestra una expresión constante en todas las cepas y condiciones ensayadas. El objetivo de utilizar un gen como control interno en los ensayos de qPCR es poder normalizar por la cantidad de ARN.

El diseño de los oligonucleótidos, tanto para el gen diana como para el gen de referencia, se llevó a cabo siguiendo los parámetros establecidos por Applied Biosystems by Life Technologies (2011): el amplicón debe ser de 50 a 150 pares de bases (pb), la longitud óptima de cada oligonucleótido es de 20 pb, el contenido de G-C debe ser entre 20-80 %, no debe haber más de 3 G consecutivas, la T<sub>m</sub> debe estar entre 58-60 °C y los cinco nucleótidos del extremo 3' no deben contener más de dos G o C.

El programa utilizado fue el proporcionado por el fabricante: una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Para detectar amplificaciones no específicas se determinó la “*melting curve*”. La presencia de un solo pico en la curva sugiere amplificaciones específicas del amplicón, sin embargo, picos adicionales pueden reflejar amplificaciones no específicas.



Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 48 pocillos MicroAmp®, cubiertas con film óptico adhesivo y los resultados fueron visualizados con el Step One Software versión 2.2.2 de Life Technologies compatible con el equipo Step One Real-Time PCR system donde se llevaron a cabo los ensayos.

### 3.6.3.2 Análisis de los datos obtenidos

Para el análisis de los resultados obtenidos en una qPCR se usa comúnmente el “*threshold cycle*”, ciclo umbral ( $C_T$ ), que se define como el primer ciclo en el cual se detecta una cantidad de fluorescencia superior al ruido de fondo. Este ciclo umbral está relacionado directamente con la concentración del ADNc diana en la muestra a analizar, ya que a mayor cantidad de amplicón, el  $C_T$  será menor.

El  $C_T$  es también representado mediante el RQ (relative quantitation) el cual indica los niveles de expresión génica relativa de cada cepa mutante respecto a la cepa salvaje. Donde el nivel de expresión de la cepa salvaje siempre es 1.

### 3.6.4 Ensayos de PCR retrotranscriptasa (RT-PCR)

Esta técnica, que se basa en la retro-transcripción del ARN a ADNc y la posterior amplificación del ADNc por PCR, ha sido utilizada para estimar diferencias a niveles de transcripción de genes determinados de forma semicuantitativa. Se utilizó el kit Transcriptor One-Step RT-PCR de Roche siguiendo las indicaciones del fabricante y el termociclador Biorad MJ Mini. El programa de RT-PCR utilizado se indica a continuación: retrotranscripción a 42 °C durante 15 min; inactivación de la retrotranscriptasa a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95 °C durante 30 s, una etapa de hibridación a 54 °C durante 30 s y proceso de extensión a 72 °C durante 30 s; extensión final a 72 °C durante 10 min. Para confirmar que las muestras no contenían restos de ADN se realizaron controles de la reacción de RT-PCR, utilizando mezclas de reacción en las que previamente se había inactivado la retrotranscriptasa por incubación a 95 °C durante 10 min. La obtención de amplificación en el control es una evidencia de la presencia de ADN en la muestra problema. La reacción de RT-

PCR fue analizada mediante la electroforesis de ADN en geles de agarosa (3.5.5) seguido por la tinción con bromuro de etidio. La obtención de imágenes se realizó con el equipo Gel Doc™ XR system de BioRad y utilizando el software Image Lab™.

### **3.7 Métodos de transferencia génica**

#### **3.7.1 Transformación bacteriana**

Para llevar a cabo la transformación de células bacterianas se obtuvieron células competentes mediante tratamiento con CaCl<sub>2</sub>, o por electroporación.

##### **3.7.1.1 Transformación bacteriana de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> (Cohen *et al.*,1972)**

Para la obtención de células competentes por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> se partió de un cultivo crecido en medio LB en agitación hasta fase exponencial temprana (DO<sub>600nm</sub> de 0,2-0,3). A continuación, se centrifugaron 10 ml del cultivo a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sedimento de células obtenido se resuspendió en el mismo volumen de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento ahora obtenido se resuspendió en 5 ml de CaCl<sub>2</sub>. El proceso se repitió dos veces más, resuspendiendo en 2,5 y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> sucesivamente. Finalmente, las células obtenidas se resuspendieron en 500 µl de CaCl<sub>2</sub>. Esta suspensión se mantuvo en hielo un mínimo de 30 min antes de su utilización. Para la transformación se cogieron 100 µl de células competentes y se mezclaron con un volumen de 1-10 µl de una suspensión de ADN. Esta mezcla se incubó durante 30 min en hielo. A continuación se sometió la mezcla a un choque térmico de 42 °C durante 45 s. Se añadió medio LB hasta un volumen de 1 ml. Para permitir la recuperación de las células transformadas, la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Por último, se seleccionaron las células que habían adquirido el plásmido en medio LB agar suplementado con el antibiótico adecuado para el plásmido transformado.

### 3.7.1.2. Electroporación (Dower *et al.*,1988)

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

Para la obtención de células electrocompetentes, se partió de un cultivo en medio LB a una  $DO_{600nm}$  entre 0,6 y 0,8. Se realizaron tres lavados por centrifugación de 10 ml del cultivo a 4 °C, y resuspensión del sedimento en 10 ml de glicerol al 10 % frío, esto permitió eliminar las sales en solución. Las células se congelaron a -80 °C hasta su utilización. En el momento de llevar a cabo la electroporación, se mezclaron 50  $\mu$ l de células con 2-5  $\mu$ l de la suspensión de ADN en una cubeta de electroporación de 1 mm (espacio entre los dos electrodos). El electroporador utilizado fue el Electroporator 2510 de la casa comercial Eppendorf®, y se utilizó un voltaje entre 1800-2500 voltios, con pulsos de 5,4 a 5,8 ms.

Una vez realizada la descarga eléctrica, a la mezcla de la transformación se le añadió 950  $\mu$ l de medio SOC, y se incubó a 30 °C o 37 °C para permitir la recuperación de las células. Tras la incubación, las células transformadas se seleccionaron en medio LB agar suplementado con los antibióticos correspondientes.

### 3.7.2 Transducción generalizada con bacteriófago P22

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

#### 3.7.2.1 Obtención de lisados P22

Para la obtención de lisados, 10 ml de un cultivo en LB en inicio de fase exponencial ( $DO_{600nm}$  de 0,15) de la cepa que contiene la mutación a transducir,

se mezcló con 100 µl de un stock de P22 de la cepa TT1704 (stock fágico inicial). Esta mezcla se incubó por aproximadamente 4 horas a 37 °C en agitación. Tras la incubación, se añadieron 500 µl de cloroformo al cultivo y se agitó vigorosamente. Tras reposar por 10 min a temperatura ambiente, esta mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. El sobrenadante obtenido (lisado fágico) se decantó en un tubo limpio y se le añadieron 500 µl de cloroformo. Los lisados obtenidos se guardaron a 4 °C hasta su uso.

### **3.7.2.2 Titulación del lisado fágico**

Se mezclaron 200 µl de un cultivo de toda la noche de la cepa TT1704 con 100 µl de diluciones seriadas del lisado fágico en 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Estas mezclas se incubaron a 37 °C por 20 min para permitir la adsorción del fago. Seguidamente se añadieron 3 ml de agar blando a cada mezcla, y se vertió todo el contenido sobre una placa de LB que se incubó a 37 °C hasta la aparición de calvas de lisis.

### **3.7.2.3 Transducción con P22**

Se mezclaron volúmenes iguales (100 µl) de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora y del lisado fágico obtenido sobre la cepa dadora o diluciones del mismo en 10 mM de MgSO<sub>4</sub> (10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>). A continuación se incubaron a 37 °C durante 1 hora y 30 min sin agitación para permitir la infección del fago, y se sembraron en placas de LB conteniendo los marcadores de resistencia a antibióticos transferidos por recombinación homóloga.

Es posible que en el proceso de transducción una célula transductante sea infectada por más de una partícula fágica. Estas células pueden volverse resistentes a subsiguientes infecciones con el fago P22, por lo que no se podrán utilizar en posteriores experimentos de transducción. Por esto, después de las transducciones con P22 es necesaria una selección de colonias libres de pseudolisógenos que se realiza sembrando en placas EBU (composición apartado 3.2.1). En estas placas se pueden distinguir las colonias de

pseudolisógenos, que tienen un color verde oscuro, de las que están libres de ellos que presentan un color verde más claro. El color verde oscuro es debido a la lisis por el fago P22 que libera productos ácidos, haciendo virar un indicador de pH que contiene el medio. Por ello se realizan un mínimo de dos estrías sucesivas a partir de colonias verdes claras.

### **3.8 Métodos de mutagénesis bacteriana**

#### **3.8.1 Inactivación de genes cromosómicos por reemplazamiento alélico**

Con este método es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a un antibiótico generado por PCR. Se utilizan oligonucleótidos que permiten la amplificación del gen de resistencia al antibiótico flanqueado por secuencias FRT, e introducen extensiones homólogas correspondientes al lugar del genoma que se quiere reemplazar.

Estas extensiones permiten la recombinación, catalizada por la recombinasa Red, con regiones flanqueantes del gen a reemplazar. Después de la selección de mutantes, la resistencia puede ser eliminada utilizando el plásmido auxiliar pCP20 que codifica la recombinasa FLP, la cual actúa sobre la repetición directa FRT adyacente al gen de la resistencia, permitiendo de esta manera su eliminación (Datsenko & Wanner, 2000).

##### **3.8.1.1 Generación del fragmento de PCR conteniendo un gen de resistencia a antibióticos**

Las resistencias a cloramfenicol del plásmido pKD3 o a kanamicina del pKD4 se amplificaron utilizando oligonucleótidos que en el extremo 3' contenían secuencias complementarias al plásmido que flanquean el gen de resistencia a antibióticos y en el extremo 5' secuencias de 30 nucleótidos homólogas al gen objeto de la delección. De esta forma se generó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia al antibiótico flanqueada por las secuencias FRT y secuencias homólogas al gen a mutagenizar en cada extremo. Tras la PCR el

fragmento de ADN fue tratado con el enzima de restricción *DpnI* y posteriormente purificado como se indica en el apartado 3.5.6

### 3.8.1.2 Reemplazamiento alélico

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

Se hizo crecer la cepa a mutagenizar, transformada previamente con el plásmido pKD46, a 30 °C en medio SOB suplementado con L-arabinosa (10 mM) y ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,6. Se obtuvieron células electrocompetentes de este cultivo (apartado 3.7.1.2). Las células electrocompetentes se electroporaron con 10-100 ng del fragmento de ADN generado por PCR. Tras el pulso eléctrico, las células se resuspendieron en 950  $\mu\text{l}$  de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 2 horas para favorecer la recombinación y permitir la recuperación de las bacterias tras el choque eléctrico. Se sembró la mitad de la suspensión en placas de LB agar con cloramfenicol o kanamicina según el caso. La otra mitad se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche y se sembró al día siguiente. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Durante la incubación a 37 °C se produce, el curado del plásmido pKD46, ya que presenta un origen de replicación termosensible. Las colonias resistentes a los marcadores utilizados fueron genotipadas por PCR.

### 3.8.1.3 Eliminación del casete de resistencia al antibiótico

Una vez comprobada la mutación, en algunos casos se quiso eliminar el gen de resistencia al antibiótico. Para ello se transformó la cepa mutante con el plásmido pCP20 que codifica para la recombinasa FLP, cuya expresión es inducible por

temperatura (42 °C). Este plásmido presenta resistencias a cloramfenicol y ampicilina, y tiene un origen de replicación termosensible. El resultado de la transformación por electroporación del plásmido pCP20 en la cepa mutante, se sembró en LB agar con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml. Las placas se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Los transformantes se sembraron en LB agar y se incubaron a 42 °C. La incubación a esta temperatura induce la expresión de la recombinasa FLP y la consiguiente eliminación del gen de resistencia al antibiótico flanqueado por secuencias FRT. Así mismo se produce la pérdida del plásmido, ya que tiene un origen de replicación termosensible. Para comprobar la pérdida tanto del plásmido como de la resistencia insertada en el cromosoma, se hicieron sucesivas estrías en medio LB agar incubando las placas a 42 °C. Tras tres o cuatro pases, se comprobó la pérdida de los marcadores utilizados para la mutación y del plásmido pCP20 mediante un pase simultáneo en placas LB agar con el antibiótico correspondiente para comprobar la pérdida del casete (cloramfenicol o kanamicina) y con ampicilina para comprobar la pérdida del plásmido. Finalmente, las cepas mutantes fueron genotipadas por PCR.

### **3.8.2 Construcción de fusiones génicas con el gen *lacZ* mediante la recombinasa FLP**

Para la creación de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* se siguió el método previamente descrito (Ellermeier *et al.*, 2002). Este método parte del protocolo de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR descrito anteriormente (apartado 3.8.1). A los clones mutantes carentes del casete de resistencia a antibióticos se les transformó de nuevo el plásmido pCP20 y, a continuación, los plásmidos pKG136 o pKG137, los cuales contienen un gen *lacZ* carente de promotor precedido por una secuencia FRT. El plásmido contiene un gen de resistencia a la kanamicina. La replicación de estos plásmidos es dependiente de la proteína *λpir*, con lo que no pueden replicarse en el interior de una célula que carezca de dicha proteína. De esta manera, al seleccionar clones resistentes a la kanamicina se obtuvieron aquellos clones en los que el plásmido se había integrado, por acción de la recombinasa FLP. Los

plásmidos pKG136 y pKG137 se diferencian únicamente en la orientación de la secuencia FRT.

### **3.8.3 Construcción de fusiones génicas con la secuencia codificante para 3Flag mediante la recombinasa FLP**

La inserción de una etiqueta 3Flag en el extremo carboxi-terminal de una proteína posibilita la detección de ésta a través de ensayos inmunológicos utilizando un anticuerpo monoclonal comercial específico para la etiqueta 3Flag. De esta manera no es necesario obtener un anticuerpo específico contra la proteína objeto de estudio.

Para llevar a cabo este tipo de construcciones, se siguió el método previamente descrito (Uzzau *et al.*, 2001). Este método parte del protocolo de inactivación de genes cromosómicos por reemplazamiento alélico descrito en el apartado 3.8.1, con algunas modificaciones. Para conseguir fusionar un gen con la secuencia codificante del 3Flag (22 aminoácidos), se diseñaron dos oligonucleótidos que amplifican un fragmento presente en el plásmido pSUB11 que contiene la secuencia codificante de la etiqueta y del casete de resistencia a kanamicina. El oligonucleótido “*forward*” contenía en el extremo 3’, los 20 primeros nucleótidos del plásmido pSUB11 que corresponden a la secuencia codificante para la etiqueta (GACTACAAAGACCATGACGG) y en el extremo 5’ la secuencia de los últimos 40 nucleótidos del gen a fusionar con el 3Flag, sin incluir la secuencia del codón de parada de la traducción. Para el oligonucleótido “*reverse*” en el extremo 3’, 20 nucleótidos del “*priming site 2*” del plásmido pSUB11 (CATATGAATATCCTCCTTAG) y en el extremo 5’, los primeros 40 nucleótidos aguas abajo del codón de parada de la traducción. De esta forma se generó un fragmento de ADN que contenía el gen de resistencia al antibiótico flanqueado aguas arriba por la secuencia codificante para el epítipo 3Flag y aguas abajo por la secuencia complementaria tras el codón de parada. Tras la PCR el fragmento de ADN fue tratado con el enzima de restricción *DpnI* y posteriormente purificado como se indica en el apartado 3.5.6



El reemplazamiento alélico se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.8.1.2

### **3.9 Técnicas experimentales con proteínas**

#### **3.9.1 Precipitación de proteína total secretada**

Este método se utilizó para detectar, por electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas secretadas por las diferentes cepas de *Salmonella*. Para ello se utilizaron cultivos bacterianos a una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Se obtuvieron sobrenadantes libres de células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y filtración con filtros de 0,22  $\mu m$  (Millex-GP; poliétersulfona, 50 mm). Las proteínas presentes se precipitaron por incubación con ácido tricloroacético (TCA) frío a una concentración final del 10 % durante 1 hora en hielo. A continuación, se centrifugó la muestra 20 min a 13000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se añadió acetona al 80 % fría. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante. El sedimento con las proteínas precipitadas se resuspendió en tampón de carga para proteínas (5 % glicerol, 2,5 %  $\beta$ - mercaptoetanol, 1,15 % SDS, 31,25 mM Tris, 0,05 % azul de bromofenol). La presencia de restos de ácido tricloroacético provocó un viraje de color del tampón de proteínas de azul a amarillo. Se añadió Tris-Base saturado para neutralizar el pH como se evidencia al retornar el color azul a la muestra. Las muestras se incubaron durante 5 min a 100 °C. Se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

En algunos casos interesó obtener extractos totales, incluyendo proteínas secretadas y células, para ello fue necesario precipitar cultivo bacteriano utilizando el mismo protocolo de precipitación con el cultivo completo.

#### **3.9.2 Obtención de extractos celulares**

Este método se utilizó para detectar proteínas intracelulares. Para ello, se recogieron las células de 1 ml de cultivo por centrifugación a 5000 rpm durante

10 min. El sedimento obtenido se resuspendió en tampón de carga para proteínas, el volumen dependió de la  $DO_{600nm}$  que tuviese el cultivo, según la siguiente relación:  $DO_{600nm}/4 = \text{Volumen de tampón de carga para proteína (ml)}$ . De esta manera se consiguió normalizar la concentración de proteína atendiendo a la biomasa de los cultivos. Una vez resuspendido el sedimento celular en el tampón de proteínas, se incubó durante 5 min a 100 °C para lisar las células.

En el caso de la obtención de extractos celulares para la detección de la proteína CsgD, se cogieron 5 mg de células bacterianas de cada cepa, crecidas en placas de LB 0 g/l de NaCl. Inmediatamente se pusieron en hielo y se resuspendieron en 200  $\mu$ l del tampón de carga para proteínas. Por último se incubaron durante 5 min a 100 °C para lisar las células.

### **3.9.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS**

Este tipo de geles separa las proteínas en función de su peso molecular. Se utilizó el equipo Miniprotean II™ de Bio-Rad. Los geles de poliacrilamida están formados por dos fases, de función y composición diferentes:

- Fase de compactación: situada en la zona superior del gel, y en donde se cargan las muestras para realizar la electroforesis. Está compuesta por un 5 % de poliacrilamida y un pH de 8,8. Su función es compactar todas las proteínas de la muestra en un solo frente antes de entrar en la siguiente fase.

- Fase de resolución: situada en la zona inferior del gel. Su función es la de separar las proteínas en función de su peso molecular. En este trabajo se utilizaron geles que contenían entre un 10-15 % de poliacrilamida y un pH de 6,8. La composición de las diferentes fases de los geles de acrilamida se detalla a continuación:

<b>Fase de compactación</b>	<b>5 %</b>
Acrilamida/Bis 30,8 % T 2,6 % C (Bio-Rad)	0,8 ml
Tampón de compactación X4 (Tris 0,375 M, SDS 0,1 % a pH 8,8)	1,25 ml
Agua destilada	2,92 ml
Persulfato de amonio (APS) 10 %	35 µl
TEMED	10 µl

<b>Fase de resolución</b>	<b>10 %</b>	<b>12,5 %</b>	<b>15 %</b>
Acrilamida/Bis 30,8 % T 2,6 % C (Bio-Rad)	2 ml	2,5 ml	3 ml
Tampón de resolución X4 (Tris 0,125 M, SDS 0,1 % a pH 6,8)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Agua destilada	2,5 ml	2 ml	1,5 ml
Persulfato de amonio (APS) 10 %	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida

%C: Porcentaje de bisacrilamida respecto a T

Para preparar el gel se añadió primero la fase de resolución hasta  $\frac{3}{4}$  partes de la altura de los vidrios, y se cubrió con agua. Una vez polimerizó esta fase, se retiró el agua y se añadió la fase de compactación. Antes que esta polimerizase se colocó el peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras. Una vez estuvo el gel preparado, se colocó en la cubeta de electroforesis, y se sumergió en tampón de recorrido (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS).

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

Se utilizaron dos tipos de marcadores de peso molecular para la electroforesis de geles de poliacrilamida:

- Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). Los pesos moleculares de las proteínas que contiene son los siguientes: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40,

30, 25, 20, 15 y 10 kDa. Este marcador se utilizó en geles que fueron posteriormente teñidos con azul de Coomassie (3.9.3.1)

- Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), que contiene una mezcla de proteínas con los siguientes pesos moleculares: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa. Estos pesos moleculares pueden variar dependiendo del lote al que pertenezca el tubo. Este marcador se utilizó en genes destinados a llevar a cabo una inmunodetección de proteínas (apartado 3.9.4).

### **3.9.3.1 Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie**

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

Se obtuvieron imágenes digitales de los geles con el equipo Gel Doc™ XR system de BioRad y utilizando el software Image Lab™.

### **3.9.4 Inmunodetección de proteínas**

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

Las proteínas separadas por electroforesis fueron electrotransferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno). Debido a la hidrofobicidad de este tipo de membranas es necesario un tratamiento previo con solventes orgánicos para anular las cargas de las mismas, por lo cual se incubaron por 10 min en metanol. A continuación, antes de realizar la transferencia, tanto el gel como la membrana se equilibraron en tampón de

transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20 % metanol, 1,3 mM SDS) durante 5 minutos.

El gel de poliacrilamida se depositó encima de la membrana, y el conjunto se situó entre ocho piezas de papel de transferencia (Whatman 3 mm), cuatro encima y cuatro debajo, mojadas en tampón de transferencia. Este bloque se colocó entre el cátodo y el ánodo de un equipo EBU 4000: Semy-Dry Blotting System CE (C. B. S. Scientific), y se procedió a la transferencia de las proteínas, aplicando un amperaje de 60 mA (4-10 voltios) durante 1 hora.

Tras la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó mediante incubación durante una hora a temperatura ambiente en PBS-T (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl pH 7,3, 0,2 % Tritón™ X-100) conteniendo leche descremada en polvo al 5 % como un agente de bloqueo.

A continuación se descartó la solución de bloqueo y se incubó la membrana a la misma temperatura durante 1 hora con el anticuerpo contra la proteína que se quería detectar, diluido en 10 ml de tampón PBS-T con leche descremada al 2,5 %. El exceso de anticuerpo fue eliminado con tres lavados de 10 min cada uno en PBS-T. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que permitía la detección del previo anticuerpo utilizado, diluido en PBS-T. El exceso de anticuerpo secundario también fue eliminado con tres lavados de 10 min cada uno en PBS-T. Las diluciones de los anticuerpos utilizados en este trabajo se indican en la siguiente tabla.

**Tabla 3.4.** Anticuerpos utilizados en este trabajo

Anticuerpo	Origen	Dilución	Referencia
<b>Primarios</b>			
α-3Flag	Ratón	1:10000	Sigma
α-SopE	Conejo	1:20000	(Miroid <i>et al.</i> , 1999)
α-CsgD	Conejo	1:5000	(Römling <i>et al.</i> , 2000)

Secundarios			
$\alpha$ -Ratón	Cabra	1:5000	Promega
$\alpha$ -Conejo	Burro	1:2000	GE Healthcare Life Bioscience

Para iniciar la reacción quimioluminiscente de revelado, se incubó la membrana durante 5 min en la solución de revelado siguiendo las recomendaciones del fabricante (ECL™ Western Blotting, GE Healthcare o LUMI-LIGHT kit de Roche). La detección y cuantificación se llevó a cabo con el equipo “Molecular Imager ChemiDoc XRS System” de Bio Rad y el software Quantity One 4.6.6.

### 3.9.5 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa (Miller, 1972)

Se hicieron crecer los cultivos en LB a 37 °C en agitación hasta la  $DO_{600nm}$  escogida, y se cogieron alícuotas de 1 ml que se mantuvieron en hielo hasta el momento de la realización del ensayo enzimático, un máximo de 24 horas. En el caso de la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *csgD*, las muestras fueron cogidas a partir de cultivos crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C por 24 horas, y resuspendidas en LB 0 g/l ajustando hasta una  $DO_{600nm}$  de 1,0.

De cada una de las alícuotas recogidas, se cogieron 100  $\mu$ l a los que se les añadieron 900  $\mu$ l de tampón Z (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). A continuación se lisaron de las células al añadir 15  $\mu$ l de tolueno y agitar vigorosamente durante 10 s. Tras la ruptura celular, se incubaron las muestras a 37 °C en agitación durante 45-60 min para provocar la evaporación del tolueno. A continuación se atemperó la mezcla a 28 °C durante 5 min. Para la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, a cada muestra se le añadieron 200  $\mu$ l de una solución de ONPG (4 mg/ml) preparado en tampón Z. Se incubó la muestra a 28 °C hasta la aparición de un color amarillo con una  $DO_{420nm}$  entre 0,3 y 0,9, momento en que se detuvo la reacción con la adición de 0,5 ml de  $Na_2CO_3$  (1 M). Se dejaron reposar las muestras unos minutos en la oscuridad, y se midieron las absorbancias a las longitudes de onda

de 420 y 550 nm. Una vez obtenidos todos los valores se calculó la actividad  $\beta$ -galactosidasa del cultivo en cuestión mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (U.M.)} = \frac{1000 \times (\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{DO}_{550\text{nm}})}{\text{T} \times \text{V} \times \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

U.M.: Unidades Miller

$\text{DO}_{420\text{nm}}$  y  $\text{DO}_{550\text{nm}}$ : absorbancia de la muestra a las longitudes de onda de 420 y 550 nm una vez detenida la reacción.

$\text{DO}_{600\text{nm}}$ : absorbancia del cultivo a 600 nm en el momento que se tomó la muestra.

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

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

### 3.10 Ensayo de citotoxicidad mediante determinación de la actividad hemolítica

Para determinar la actividad hemolítica de las diferentes cepas de *Salmonella* se siguió el protocolo previamente publicado (Field *et al.*, 2008) con algunas modificaciones.

Las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 2,0. Una alícuota de 5 ml de cultivo bacteriano fue centrifugada por 15 minutos a 6000 rpm. El sobrenante obtenido fue filtrado a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex-GP; poliétersulfona, 50 mm) y mantenido en hielo. La reacción de hemólisis se llevó a cabo en placas de 96 pocillos donde se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de diferentes diluciones del sobrenadante filtrado, con 50  $\mu\text{l}$  de una solución de sangre defibrinada de oveja. Se incubó la placa a 37 °C durante 2,5 horas y se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de PBS frío para detener la reacción. A continuación, se centrifugaron las placas a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C para separar la fracción soluble de la insoluble conteniendo ésta, principalmente, células sanguíneas intactas o restos de células lisadas. Se retiraron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a un nuevo pocillo. La actividad hemolítica fue determinada por estimación de la cantidad de hemoglobina liberada al medio, midiendo

espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550nm los sobrenadantes obtenidos.

Para preparar la suspensión de sangre se cogieron 5 ml de sangre desfibrinada de oveja (Oxoid) y se lavaron cuatro veces con PBS frío centrifugando a 3000 rpm a 4 °C, resuspendiendo finalmente en un volumen de 10 ml de PBS.

### **3.11 Ensayos fisiológicos**

#### **3.11.1 Estudios de formación de biofilm**

Estos experimentos se realizaron con el objetivo de analizar la capacidad de formación de biofilm de las diferentes cepas de *Salmonella*. El protocolo utilizado esta basado en el descrito por Aberg *et al* (2006).

Se crecieron las cepas de interés en medios de cultivo de LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,5-0,7. Se mezclaron 50  $\mu$ l de cultivo más 150  $\mu$ l de LB 0 g/l de NaCl en una placa de 96 pocillos (poliestireno, no tratadas para cultivo celular, fondo en U); sembrando 8 réplicas (pocillos) por cepa e incluyendo la misma cantidad de controles negativos que contenían 200  $\mu$ l de medio de cultivo LB 0 g/l de NaCl. Se incubó la placa a 25 °C por 48 horas sin agitación.

Después de la incubación, el medio fue cuidadosamente descartado usando una pipeta multicanal y los pocillos fueron lavados con 200  $\mu$ l de PBS. En este punto fue importante no tocar el biofilm pegado a las paredes del pocillo, y retirar los restos de PBS lo más rápido posible para evitar que el biofilm se disolviera en el mismo. El biofilm producido fue fijado con 200  $\mu$ l de metanol al 99 % por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el metanol directamente sin la ayuda de una pipeta (en este punto el biofilm ya está enganchado al plástico) y la placa se dejó secar al aire. El biofilm fue teñido con 200  $\mu$ l de cristal violeta al 0,1 % (disuelto en agua) por 15 min.



A continuación, el cristal violeta fue descartado y la placa se lavó con agua destilada hasta eliminar los excesos del colorante. Nuevamente se dejó secar al aire. Para cuantificar la cantidad de biomasa presente en los biofilms, el cristal violeta fue solubilizado con 160 µl de ácido acético glacial al 33 % (v/v), pipeteando cuantas veces fuera necesario para recuperar el colorante retenido. La cuantificación se realizó con 100 µl de esta suspensión en una nueva placa y usando un espectrofotómetro ASYS UVM 340 a  $DO_{545nm}$ .

La capacidad de formar biofilm también se monitorizó usando placas de agar Congo red (composición en el apartado 3.2.1) en las cuales la formación de biofilm se ve reflejada en el morfotipo rdar (*red, dry and rough*). Estos ensayos se realizaron al incubar la placa a 28 °C por 7 días y a 37 °C por 24 horas según las cepas.

### **3.11.2 Estudios de motilidad**

Para estos experimentos se siguió el protocolo descrito previamente (Ahmad *et al.*, 2013). Las placas para estos ensayos de motilidad (composición en el apartado 3.2.1) se realizaron un día antes de su uso y cada placa contenía exactamente 25 ml de medio.

Con ayuda de una punta para micropipeta, se inocularon colonias de las cepas de interés en el agar para motilidad con cuidado de no llegar al fondo del mismo. Se sembraron 6 placas en cada experimento y se incubaron a 37 °C durante 6,5 horas. A continuación, se midió el recorrido de las células representado por un halo alrededor de la picadura (diámetro en centímetros), haciendo una media entre el total de las placas para cada cepa.

### **3.11.3 Análisis de resistencia al estrés oxidativo**

Este ensayo se realizó con el fin de analizar la capacidad de *Salmonella* de hacer frente a diferentes dosis de agentes oxidantes y determinar la tasa de muerte

durante estas condiciones. Para ello, se utilizó el protocolo descrito (Nachin *et al.*, 2005) con algunas modificaciones.

Se crecieron las cepas de interés en medios de cultivo de LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. A 2 ml de cultivo se les agregó el respectivo volumen de t-BOOH (*tert*-butyl-hidroperoxido) al 0,5 % para llegar a una concentración final de 0,004 % y se usó como control negativo la ausencia de t-BOOH. Esta mezcla se incubó por 1 hora a 37 °C sin agitación. La viabilidad de las células después de la exposición fue determinada como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml) sobre placas de LB.

#### **3.11.4 Detección de bacteriófagos**

Las cepas bacterianas fueron crecidas en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,1. Los cultivos fueron divididos en dos, uno de ellos fue inducido con 50 µg/ml de mitomicina C, y se continuó la incubación de ambos por 2 y 6 horas más. Las partículas fágicas liberadas en el cultivo fueron detectadas por titulación en agar blando usando las cepas WG49 y MA6247 indicadoras de la producción de fagos totales, y Gifsy 1 y 2, respectivamente, después de 18 horas a 37 °C.

#### **3.11.5 Ensayos de invasión sobre células HT-29**

Estos ensayos se llevaron a cabo con el objetivo de determinar la capacidad de invasión de células eucariotas por parte de las diferentes cepas de *Salmonella* siguiendo el protocolo previamente descrito (Ahmad *et al.*, 2013). Las células utilizadas fueron HT-29 (ATCC HTB 38), una línea celular procedente de un adenocarcinoma colorectal humano con morfología epitelial. Los ensayos se llevaron a cabo sobre una monocapa confluyente de células HT-29 cultivadas en placas de 24 pocillos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 98 % de humedad en medio RPMI 1640 suplementado con 25 mM de hepes y 2mM de L- glutamina (Life Technologies), suero fetal bovino 10 % (Hyclone) y penicilina-estreptomina (Thermo Fisher Scientific).

Las células bacterianas fueron crecidas hasta fase exponencial ( $DO_{600nm}$  de 0,6) en LB con 0,3 M de NaCl en estático. Una vez en la  $DO_{600nm}$  requerida, 1 ml de cada cultivo de células bacterianas se separó del sobrenadante por centrifugación (5 min a 4500 rpm a 4 °C), y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS frío para lavar las células. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación y el sedimento fue resuspendido en medio RPMI. Durante todo este proceso las células bacterianas siempre fueron mantenidas en hielo. Una hora antes de la infección, a la monocapa de células HT-29 le fue cambiado el medio RPMI por uno fresco y justo antes de la infección se realizó un nuevo lavado con RPMI y a continuación con PBS. Tras eliminar el PBS se añadieron 900  $\mu$ l de RPMI fresco más el antibiótico o inductor correspondiente para la célula bacteriana que llevaría a cabo la infección, más 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en medio RPMI. Esta mezcla se incubó 1 hora a 37 °C en 5 % de  $CO_2$ . Como norma general en cada ensayo de infección se realizaron dos réplicas técnicas por cada cepa de *Salmonella* y como mínimo dos réplicas biológicas de cada experimento en días distintos.

Después de la hora de infección, los pocillos fueron lavados eliminando el sobrenadante y añadiendo 1 ml de PBS. A continuación se añadió 1 ml de RPMI con gentamicina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml a la monocapa de células infectadas con el fin de eliminar las bacterias extracelulares, y fueron incubadas a 37 °C en 5 % de  $CO_2$ . Una hora después del tratamiento con gentamicina las células epiteliales fueron lavadas 3 veces con PBS y lisadas al incubar con 1 ml de RPMI suplementado con Tritón™ X-100 (1 %) por 5 min a 37 °C. El lisado fue transferido a un tubo de microcentrífuga. Para determinar la concentración de bacterias intracelulares (unidades formadoras de colonia/ml), se hicieron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-2}$  en placas de LB con el correspondiente antibiótico. También se realizó el recuento de viables para la suspensión de células inicial antes de la infección, para ello se plaqueó la dilución  $10^{-5}$ . El porcentaje de invasión se calculó como el número de bacterias después de la infección dividido por el número de bacterias antes de la infección\*100.

## **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

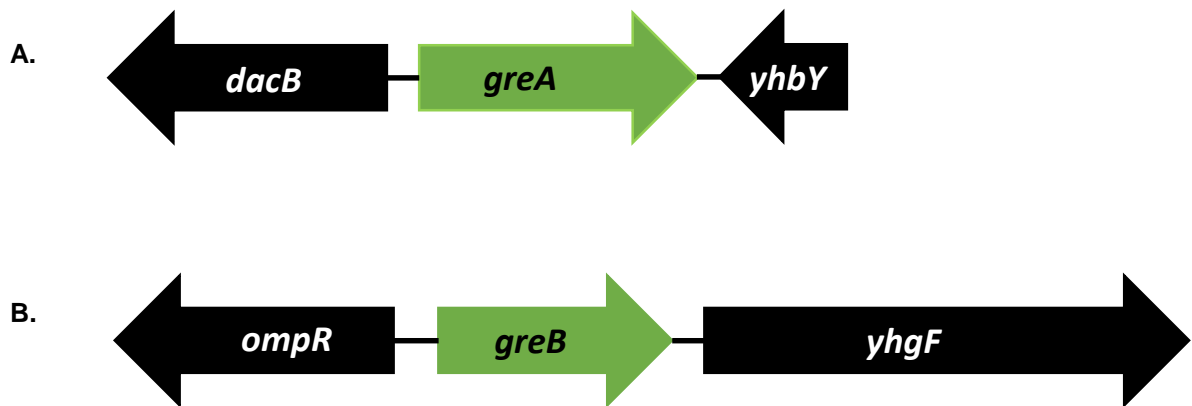
### 4.1 Caracterización de mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB* en *S. Typhimurium* SL1344

#### 4.1.1 Obtención de cepas mutantes para *greA* y *greB* por reemplazamiento alélico en *S. Typhimurium* SL1344 *his*<sup>+</sup>

Como se ha explicado anteriormente, los factores Gre promueven la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol cuando ésta se encuentra en un estado pausado asegurando de este modo la fidelidad de la transcripción (Borukhov *et al.*, 1993; Erie *et al.*, 1993). Para llevar a cabo el estudio del papel de los factores Gre en la fisiología y patogenicidad de *Salmonella*, se decidió estudiar el efecto que causa en la célula la ausencia de estos factores, para lo que fue necesario mutar los genes *greA* y *greB* en la cepa SV5015 (*S. Typhimurium* SL1344 *his*<sup>+</sup>).

La mutación en los genes *greA* y *greB*, se realizó mediante la técnica de inactivación de genes cromosómicos por reemplazamiento alélico descrita en el apartado 3.8.1. El gen *greA* en la cepa SV5015 está flanqueado aguas arriba por el gen *dacB* y aguas abajo por el gen *yhbY*, ambos orientados en dirección opuesta a *greA*. Esta organización es común en todas las enterobacterias. Por su parte, *greB* está flanqueado por *ompR*, orientado en dirección opuesta a *greB* y *yhgF* orientado en la misma dirección que *greB* (figura 4.1). La distancia entre *greA* y *greB* es de 828651 pb. La ubicación genómica de *greA* claramente sugiere que se trata de una operón monocistrónico. En el caso de *greB* podría co-transcribirse junto con *yhgF* y otros 5 genes que se encuentran aguas abajo de éste. La distancia entre *greB* y *ompR* es de 226 pb y bioinformáticamente es posible predecir una secuencia promotora para *greB* (*software online Berkeley Drosophila Genome Project*). La región intergénica entre el gen *greB* y el gen *yhgF* tiene un tamaño de 102 pb lo que sugiere que *yhgF* podría presentar una secuencia promotora propia. La distancia entre *yhgF* y el operón aguas abajo *feoABC* es de aproximadamente unas 437 pb y se predicen 3 posibles secuencias terminadoras Rho-independientes (*software online ARNold finding*

*terminators*). Sugiriendo que *greB* e *yhgF* pueden considerarse operones monocistrónicos.



**Figura 4.1.** Organización espacial de los genes *greA* (A) y *greB* (B) en el genoma de *S. Typhimurium* SL1344. El gen *greA* está en la posición 3326917-3327939 y *greB* en la posición 4156590-4157063.

En la figura 4.2 se muestran las secuencias completas de los genes *greA* y *greB* de *S. Typhimurium* SV5015 y los sitios en los cuales se realizó la deleción para la obtención de los mutantes. Los oligonucleótidos P1 y P2 correspondientes utilizados para delimitar la deleción de cada gen, se especifican en la tabla 3.3. Para ambos genes, la deleción se realizó en el nucleótido número 9 contado a partir del codón de inicio de la traducción ATG, hasta 2 codones antes del final del gen. Únicamente se conservan los codones que codifican para los aminoácidos metionina, glutamina, alanina, tirosina y leucina (M, Q, A, Y, L) en *greA* y los codones para metionina, lisina, treonina, valina y lisina (M, K, T, V, K) en *greB*. En ambos casos los 3 primeros codones son los del inicio de la pauta de lectura abierta y los 2 últimos los del final.

Una vez obtenidas las cepas mutantes (*greA::km* y *greB::km*) con deleción del fragmento indicado e inserción del gen de resistencia a kanamicina, se eliminó este gen de resistencia resultando los mutantes por deleción (*greA* y *greB*), que fueron utilizados para la creación de fusiones génicas *lacZ* mediante integración del plásmido pKG136 (apartado 3.8.2).

A. *greA*

greAP1 fusión *lacZ*

```

61 gttcattgccccctacaggaatgttcaagaggtataacaaATGCAAGCTATTCGGATGAC
121 CTTACGCGGAGCCGAAAACTGCGGAAGAGCTGGATTTTCTGAAATCTGTGCGCCGTCC
181 TGAAATCATCGCCGCTATCGCCGAAGCGCGGAACATGGCGATTTAAAGAAAACGCGGA
241 GTATCATGCTGCACGCGAACAGCAGGGTTTCTGCGAAGGGCGCATTAAAGATATCGAAGC
301 AAAACTGTGGAATGCGCAGGTGATTGATGTCATAAAATGCCGAACAATGGTCGCGTGAT
361 TTTGCGCGCTACCGTCACGGTGTGAACCTGGACACCGACGAAGAGCAGACCTACCGCAT
421 TGTGCGGACGATGAGGCGGATTTTAAGCAAATCTCATTTGCGTAAACTCGCCAATCGC
481 TCGCGGCCTGATCGGCAAAGAGCAGGATGACGTCGTGGTGTATCAAAACGCCCTGGCGGCGA

541 TGTGGAATACGAAGTGCTTAAAGTGAATACCTTTAAAgcagtactcaatacgcaaattgt
601 tgggtgattgtaaagaaaggaaaaaggccgcgatagcggccttttatcaacggagagagcg

```

greAP2

B. *greB*

greBP1 fusión *lacZ*

```

61 cccgtgtgcgcaatatcgacagcaaaggtaaatcaacgagATGAAAACGCCCTGATCAC
121 CCGCGAAGGGTACGAAACTCAAAACAAGAGCTCAATTATCTCTGGCGTGAAGAGCGCCC
181 GGAGGTCACCAAAAAAGTGACCTGGGCTGCGAGTCTGGGCGACCGCAGCGAGAATGCCGA
241 CTATCAGTATAATAAAAAGCGCTGCGTGAGATCGACAGACGCGTCAGATATCTGACCAA
301 ATGCATGGAAAATCTCAAAATCGTGGATTATTTCCCGCAGCAGGAGGGCAAAGTCTTCTT
361 CGGCGCCTGGGTGAAAATGAAAATGATGACGGCGATAGGCTGAAGTTCCGCATTGTTCGG
421 CTACGATGAAAATTTTCGGACGTAAGGATTACATCTCTATCGACTCGCCGATGGCGGGGC
481 GCTACTGAAAAAAGAAGTGGGCGATCTGGCGGTGGTCAACACCCTGTGCGCGAAGCAAA

541 CTGGTACGTCAATGCGATCGAATACGTCAAATAAgacaagaagaatcctaagcccccgct
601 gatggctgcatTTTTTgcccagccaatccgtataactatcccctgatTTTTTatcctgaaga

```

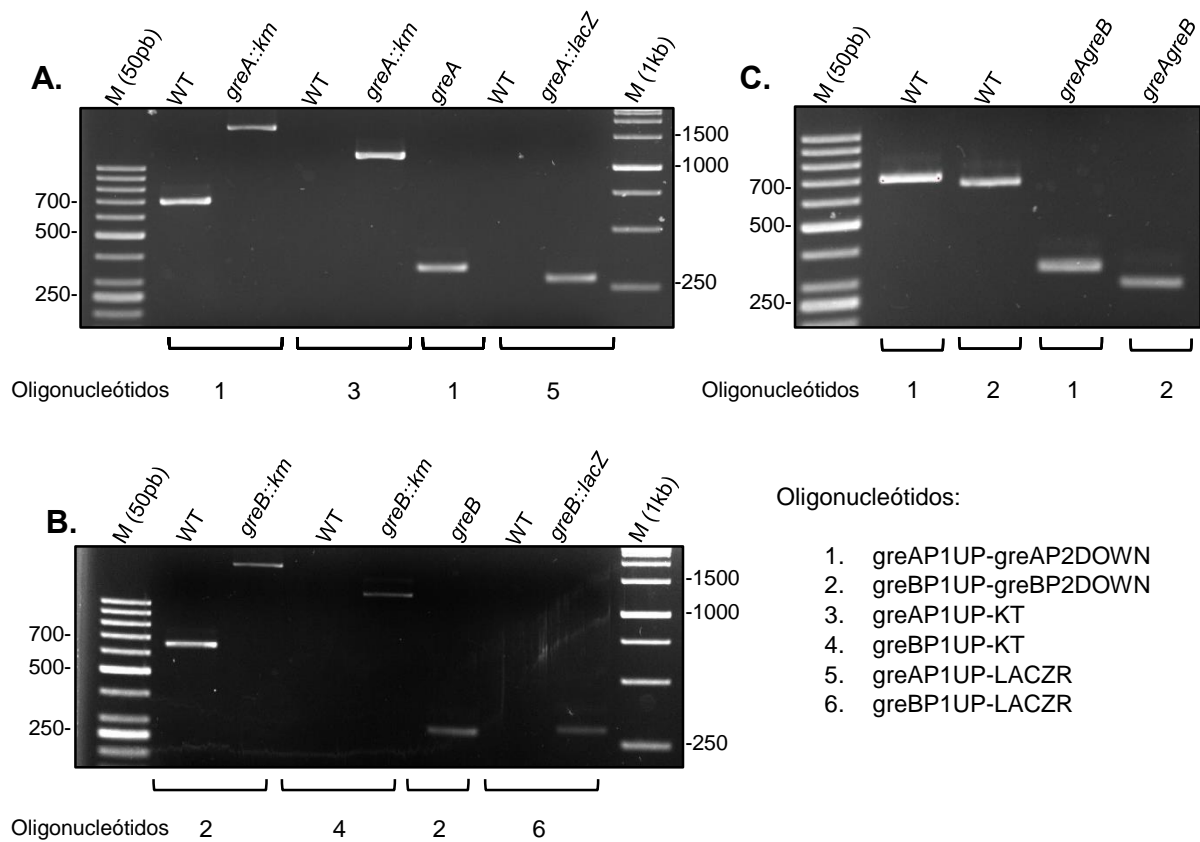
greBP2

**Figura 4.2.** Secuencia de los genes *greA* (A) (Gene ID: 11766254; locus\_tag=SL1344\_3271) y *greB* (B) (Gene ID: 11766405; locus\_tag=SL1344\_3470). En verde y mayúsculas se muestran las secuencias codificantes de ambos genes. Los codones de inicio y final de traducción están resaltados en amarillo. Las letras sombreadas en gris indican la localización de los oligonucleótidos P1 y P2 utilizados para delimitar la delección. El triángulo rojo representa el lugar de la inserción de la fusión transcripcional con el gen reportero *lacZ*.

Para la obtención de la cepa doble mutante *greA**greB*, se utilizó el protocolo de transducción generalizada con el bacteriófago P22. A la cepa  $\Delta$ *greA* se transdujo la mutación *greB::km* y a continuación se eliminó el gen de resistencia a la kanamicina. Mediante el uso de oligonucleótidos específicos localizados aguas arriba y aguas abajo de los genes *greA* y *greB*, así como oligonucleótidos



específicos del gen de resistencia a la kanamicina y del gen *lacZ*, se pudo realizar el genotipado de todas las cepas obtenidas (figura 4.3).



**Figura 4.3.** Genotipado de las cepas derivadas de SV5015. Las cepas mutantes analizadas son: *greA::km*, *greB::km*, *greA* (TGC-1), *greB* (TGC-2) y *greAgreB* (TGC-3) y las cepas conteniendo las fusiones *greA::lacZ* (TYLL-1) y *greB::lacZ* (TYLL-2).

**A.** Genotipado de las cepas con mutaciones en el gen *greA*: la pareja de oligonucleótidos 1 (*greAP1UP-greAP2DOWN*) amplifican un fragmento de 695 pb en la cepa WT, 1712 pb en la cepa *greA::km* y 301 pb en la cepa *greA* (TGC-1). La pareja de oligonucleótidos 3 (*greAP1UP-KT*), no amplifican en la cepa WT y en la cepa *greA::km* amplifican un fragmento de 1175 pb. La confirmación de la introducción de la fusión *lacZ* se realizó con la pareja de oligonucleótidos 5 (*greAP1UP-LACZR*), donde en la cepa WT no hay amplificación y en la cepa *greA::lacZ* (TYLL-1) se amplifica un fragmento de 255 pb.

**B.** Genotipado de las cepas con mutaciones en el gen *greB*: la pareja de oligonucleótidos 2 (*greBP1UP-greBP2DOWN*) amplifican un fragmento de 650 pb en la cepa WT, 1670 pb en la cepa *greB::km* y 250 pb en la cepa *greB* (TGC-2). La pareja de oligonucleótidos 4 (*greBP1UP-KT*), no amplifican en la cepa WT y en la cepa *greB::km* amplifican un fragmento de 1188 pb. La confirmación de la introducción de la fusión *lacZ* se realizó con la pareja de oligonucleótidos 6 (*greBP1UP-LACZR*), donde en la cepa WT no hay amplificación y en la cepa *greB::lacZ* (TYLL-2) se amplificó un fragmento de 268 pb.

C. Genotipado de la cepa con la mutación en ambos genes *greA* y *greB*: posterior a la transducción de la mutación *greB::km* a la cepa *greA* (TGC-1), también se eliminó el casete *km<sup>R</sup>* a la mutante *greB::km*, resultando en la cepa doble mutante *greA<sup>R</sup>greB* (TGC-3). Se comprobó usando las parejas de oligonucleótidos 1 y 2, respectivamente.

El carril M corresponde a una mezcla de ADN con sus tamaños indicados en pb.

#### 4.1.2 Regulación de los genes *greA* y *greB*

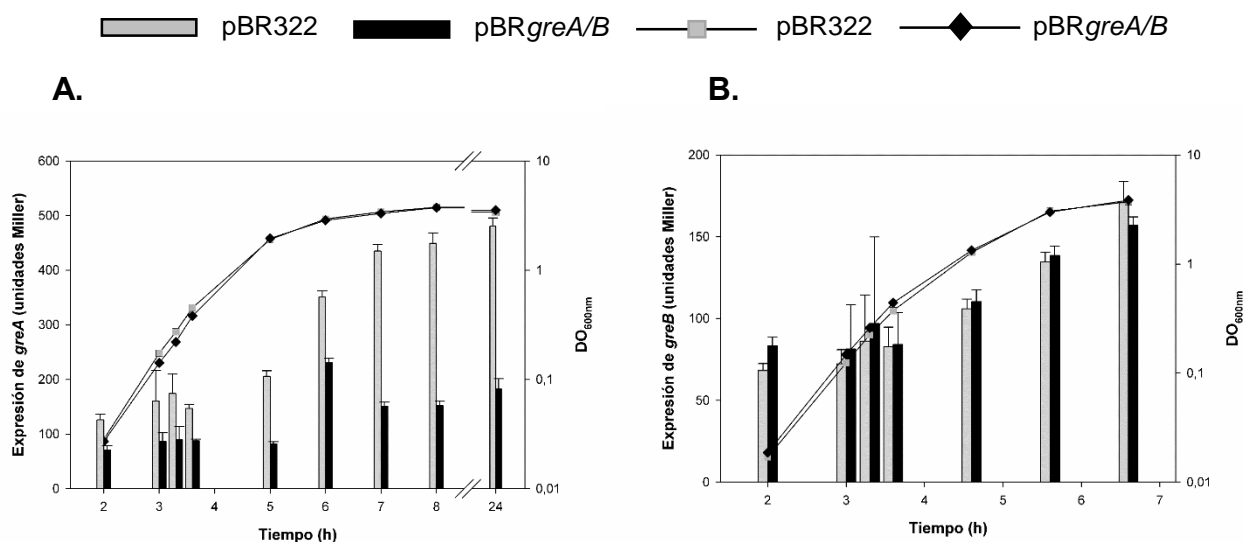
En este trabajo la regulación de la expresión de los factores Gre en *Salmonella* ha sido estudiada. En *E. coli*, los datos existentes indican que *greA* se encuentra autorregulada negativamente. Potrykus *et al.*, (2010) determinaron la expresión en una fusión transcripcional *greA::lacZ*, en presencia y en ausencia de GreA, y observaron un incremento de 3 veces en la expresión de *greA* en ausencia de la proteína, indicando autorregulación negativa. En otros estudios se ha demostrado que la expresión de *greA* disminuye en fase estacionaria, respecto a la fase exponencial. Este efecto a nivel de la curva de crecimiento requiere de la presencia de GreA, indicando que GreA se autorreprime en fase estacionaria (Fernández-Coll, 2015). En el caso de *greB* de *E. coli*, se ha demostrado que su expresión se induce en fase estacionaria y no se encuentra autorregulada (Vinella *et al.*, 2012).

Para llevar a cabo los estudios de regulación transcripcional de los genes *greA* y *greB* de *Salmonella*, se utilizaron las cepas TYLL-1 y TYLL-2 que contienen en el cromosoma fusiones transcripcionales de *greA* y *greB* con *lacZ*, respectivamente. Paralelamente, los genes *greA* y *greB* fueron clonados en el plásmido pBR322 para realizar la complementación génica, ya que en ambas fusiones los genes *greA* y *greB* han sido deletados y sólo quedan sus promotores y los primeros codones de la proteína. Se realizó una curva de crecimiento de cultivos de las cepas TYLL-1 y TYLL-2 en LB a 37 °C en agitación y la expresión transcripcional de *greA* y *greB* se analizó en diferentes puntos de la curva, mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

En el caso del estudio de la expresión del gen *greA*, los resultados (figura 4.4 A) muestran que en presencia del vector control, la expresión de *greA* aumenta a

través de la curva de crecimiento y se estabiliza al llegar a fase estacionaria entre las 6 y 24 horas de crecimiento. Al complementar la mutación con el plásmido pBR*greA*, se observa que los niveles de expresión a lo largo de la curva de crecimiento son mas bajos que en la cepa conteniendo el vector control, indicando una autorregulación clara de *greA*. Los niveles de expresión de *greA* aumentan en fase estacionaria tanto en presencia como en ausencia de GreA, a diferencia de lo que ocurría en *E. coli*. Estos resultados sugieren que existe una autorregulación negativa por parte de *greA* que juega un papel relevante en el mantenimiento de los niveles apropiados de GreA en la célula a lo largo de la curva de crecimiento.

En el caso de *greB*, su expresión aumenta a través de la curva de crecimiento. Sin embargo, contrario a *greA*, no se observan diferencias significativas entre su expresión con o sin la complementación con GreB (figura 4.4 B), indicando ausencia de autorregulación. Estos resultados son consistentes con los previamente descritos en *E. coli* (Vinella *et al.*, 2012).



**Figura 4.4.** Expresión transcripcional de los genes *greA* y *greB* de *Salmonella* a lo largo de la curva de crecimiento. **A.** Para el estudio de la expresión de *greA*, la cepa TYLL-1 conteniendo el plásmido pBR322 (vector control) o pBR*greA* fueron utilizadas. Los cultivos fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación tras ser inoculados a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. Se cogieron muestras de los cultivos a los tiempos indicados (eje X), la DO<sub>600nm</sub> (líneas) y la actividad β-galactosidasa (barras) fueron determinadas. **B.** Para el estudio de la expresión de *greB* se realizó el mismo

procedimiento con la cepa TYLL-2 conteniendo los plásmidos pBR322 y pBR*greB*. En A y en B, las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

Se realizaron estudios *in silico* comparando las secuencias de los factores Gre y los genes que los codifican en *E. coli* (MG1655) y *Salmonella* (SL1344). Las proteínas GreA de *E. coli* y *Salmonella* presentan un 96,83 % de identidad y un 99,36 % de similitud (figura 4.5 A) indicando que son básicamente idénticas. De hecho, en el apartado 4.2.7 se demuestra que la proteína GreA de *E. coli* puede complementar funcionalmente la mutación de *greA* de *Salmonella*, corroborando la similitud descrita.

Interesantemente, al alinear los genes *greA* de *E. coli* y *Salmonella* tanto las regiones intergénicas aguas arriba del codón ATG de *greA* como las secuencias codificantes (figura 4.5 B y C), se observó una importante conservación de ambas a nivel de ADN. El porcentaje de identidad es de 80,89 % y 85,95 % para la región intergénica y la secuencia codificante, respectivamente. Como se observa, el porcentaje de identidad obtenido al alinear las secuencias codificantes de los genes *greA* de ambas especies es mas bajo que el obtenido al alinear las secuencias de aminoácidos de la proteína GreA, esto estaría reforzando la importancia de mantener los aminoácidos de la proteína GreA para su funcionalidad. También es remarcable que en la región intergénica de *greA* en *Salmonella* se encontraron los promotores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^E$  dependientes descritos en *E. coli* (figura 4.5 B) (Potrykus *et al.*, 2010).

Estudios similares fueron realizados para comparar las proteínas GreB, regiones intergénicas y secuencias codificantes de los genes *greB* de *E. coli* y *Salmonella*. Las proteínas GreB de *E. coli* y *Salmonella* presentan un 94,26 % de identidad y un 94,93 % de similitud (figura 4.5 D) indicando que son casi idénticas tal y como se observa para GreA. En el alineamiento de las regiones intergénicas se tuvieron en cuenta 297 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de traducción ATG pues el promotor de *greB* no ha sido identificado ni en *E. coli* ni en *Salmonella*. Mediante herramientas bioinformáticas, estudios previos describieron dos regiones -10 del supuesto promotor de *greB* de *E. coli*

## Resultados

(Fernández- Coll, 2015) (Münch *et al.*, 2005). Al alinear las regiones intergénicas de ambas especies se observa que *greB* de *Salmonella* no presenta una de las dos regiones denominadas -10 descritas en *E. coli*. Sin embargo el porcentaje de identidad de las regiones intergénicas de ambas especies es de 87,75 % y las secuencias codificantes de los genes *greB* de *E. coli* y *Salmonella* presentan una identidad de 85,44 % (figura 4.5 E y F). El porcentaje de identidad de las proteínas GreB es más alto que el porcentaje de identidad de las secuencias codificantes de los genes *greB* entre ambas especies, lo mismo que ocurre en GreA.

**A.**

	1						60
GreA <i>E. coli</i>	MQAIPMTLRG	AEKLREELDF	LKSVRRPEII	AAIAEAREHG	DLKENAEYHA	AREQQGFCEG	
GreA <i>Salmonella</i>	MQAIPMTLRG	AEKLREELDF	LKSVRRPEII	AAIAEAREHG	DLKENAEYHA	AREQQGFCEG	
Consensus	MQAIPMTLRG	AEKLREELDF	LKSVRRPEII	AAIAEAREHG	DLKENAEYHA	AREQQGFCEG	
	61						120
GreA <i>E. coli</i>	RIKDIEAKLS	NAQVIDVTKM	PNNGRVIFGA	TVTVLNLDSD	EEQTYRIVGD	DEADFKQNLI	
GreA <i>Salmonella</i>	RIKDIEAKLS	NAQVIDVTKM	PNNGRVIFGA	TVTVLNLDTD	EEQTYRIVGD	DEADFKQNLI	
Consensus	RIKDIEAKLS	NAQVIDVTKM	PNNGRVIFGA	TVTVLNLDSD	EEQTYRIVGD	DEADFKQNLI	
	121						158
GreA <i>E. coli</i>	SVNSPIARGL	IGKEEDDVVV	IKTPGGEVEF	EVIKVEYLL			
GreA <i>Salmonella</i>	SVNSPIARGL	IGKEQDDVVV	IKTPGGDVEY	EVIKVEYLL			
Consensus	SVNSPIARGL	IGKE#DDVVV	IKTPGG#VE%	EVikVEYLL			

# Aminoácido del grupo NDQEBZ  
% Aminoácido del grupo FY

**B.**

	1						50
<i>greA E. coli</i>	CTCGCGCTAA	CAACCTGGAA	TCGAGCCGTC	ATACTACGGC	GCAACGCCCT		
<i>greA Salmonella</i>	CTCGCGCTAA	CACCTGGAA	ACAGCCGTC	ATACTACGGC	GCAACGCCCT		
Consensus	CTCGCGCTAA	CAaCCTGGAA	aCaAGCCGTC	ATACTACGGC	GCAACGCCCT		
	51						100
		<b>-35σ70</b>	<b>-35σE</b>	<b>-10σ70</b>	<b>-10σE</b>		
<i>greA E. coli</i>	ATAAAGTAAA	CGATGACCT	TCGGGAACT	CAGGGTAAAA	TGACTATCAA		
<i>greA Salmonella</i>	AAAAAGTAAA	CGATGACCA	TAGGGAACT	CAGGGTAAAA	TGGTATCAA		
Consensus	AaAAAGTAAA	CGATGACCA	TaGGGAACT	CAGGGTAAAA	TGacTATCAA		
	101						150
<i>greA E. coli</i>	AATGTGAATT	GTAGCTGACC	TGGGACT.TG	TACCCGGGT	GGTATTTTTT		
<i>greA Salmonella</i>	AGAGGAAATT	GTAGCTGACC	TGGGACTCG	CGCCCGGTT	GGTGTTTTTT		
Consensus	AaaGgaAATT	GTAGCTGACC	TGGGACT.cG	caCCCGGTC	GGTaTTTTTT		
	151						200
<i>greA E. coli</i>	TGCTTCTGGT	CCCGGTAAGG	AGTTATGCCG	GGCAGGCCGA	ACAGCCGGGG		
<i>greA Salmonella</i>	TGCTTCTGAC	CCTGGTATGG	CATATGCCG	GGCTGGCTTA	GCAGCCGGGG		
Consensus	TGCTTCTGac	CCcGGTAaGG	aaTaagcCcG	GGCaGGCcG	aCAGCCGGGG		
	201						245
<i>greA E. coli</i>	TGGGTGAAGA	CTTGCCCTAT	CAGGAATATT	CAAGAGGTAT	AACAA		
<i>greA Salmonella</i>	TAGA.GTTCA	TTGCCCTA	CAGGAATGTT	CAAGAGGTAT	AACAA		
Consensus	TaGa.GaacA	cTgcCCCcaa	CAGGAATaTT	CAAGAGGTAT	AACAA		

**C.**

```

1                                     50
greA E. coli ATGCAAGCTA TTCCGATGAC CTTACGCGGC GCTGAAAAAT TACGCGAAGA
greA Salmonella ATGCAAGCTA TTCCGATGAC CTTACGCGGA GCcGAAAAAC TcCGCGAAGA
Consensus ATGCAAGCTA TTCCGATGAC CTTACGCGGa GCcGAAAAAC TaCGCGAAGA

51                                     100
greA E. coli GCTGGATTTT CTGAAATCTG TGCGCCGTCC TGAAATCATt GCTGCTATCG
greA Salmonella GCTGGATTTT CTGAAATCTG TGCGCCGTCC TGAAATCATc GCcGCTATCG
Consensus GCTGGATTTT CTGAAATCTG TGCGCCGTCC TGAAATCATc GCcGCTATCG

101                                    150
greA E. coli CcGAAGCGCG TGAGCATGGC GACCTGAAAG AAAACGCcGA ATACcAcCGCA
greA Salmonella CcGAAGCGCG cGAAcATGGC GATTTA AAAAG AAAACGCcGA cTATcATGCTt
Consensus CcGAAGCGCG cGAAcATGGC GAccTaAAAAG AAAACGCcGA aTAcCaCGCA

151                                    200
greA E. coli GCTCGTGAAC AGCAGGGTTT CTGCGAAGGc CGTATTAAAG ACATCGAAGC
greA Salmonella GCACcCGGAAC AGCAGGGTTT CTGCGAAGGc CGcATTAAAG ATATCGAAGC
Consensus GCaCgCGAaAC AGCAGGGTTT CTGCGAAGGc CGcATTAAAG AcATCGAAGC

201                                    250
greA E. coli CAAGCTGTTCG AACGCGCAGG TGATTGATGT CACcAAAATG CcCAACAATG
greA Salmonella AAAA CTGTTCG AAcGCGCAGG TGATTGATGT CACTAAAATG CcGAACAATG
Consensus aAAaCTGTTCG AAcGCGCAGG TGATTGATGT CACcAAAATG CcCAACAATG

251                                    300
greA E. coli GcCGCGTtAT TTTTGGTtGCT ACCGTaACGG TGCTGAATcCT GGATtCTGAC
greA Salmonella GtCGCGTcAT TTTcGGcGCT ACCGTcACGG TGCTGAAcCT GGAcAcCGAC
Consensus GgCGCGTgAT TTTcGGcGCT ACCGTaACGG TGCTGAAcCT GGAcAcCGAC

301                                    350
greA E. coli GAAGAAcAGA CTTATcGCAT cGTTGGCGAT GAcGAAGcTG AcTTTAAAcA
greA Salmonella GAAGAGcAGA CcTAcCGCAT tGTTGGCGAc GATGAGGcGg ATTTTAAGcA
Consensus GAAGAAcAGA CcTAcCGCAT cGTTGGCGAc GAcGAAGcGg AcTTTAAAcA

351                                    400
greA E. coli AAACCTGATT TcTGTAAACT CGCCtATtGC TCGTGGCCTG ATCGGCAAAG
greA Salmonella AAAtCTcATT TcCGTAAACT CGCCAAcGC TCGcGGCCTG ATCGGCAAAG
Consensus AAACCTcATT TcGgTAAACT CGCCaATcGC TCGcGGCCTG ATCGGCAAAG

401                                    450
greA E. coli AAGAAcGATGA TGTtGTGGTc ATCAAAACGC CgGGCGGCGA AGTAgAATtTt
greA Salmonella AcCAGcGATGA cGTcGTGGTg ATCAAAACGC CtGGCGGCGA tGTgGAATAc
Consensus AacAaGATGA cGTcGTGGTc ATCAAAACGC CgGGCGGCGA aGTaGAATAc

451                                    477
greA E. coli GAAGTAAcTTA AcGTGGAATA CCTGTAa
greA Salmonella GAAGTcCTTA AAcGTGGAATA CCTtTAA
Consensus GAAGTaaTTA AaGTGGAATA CCTgTAA

```

## Resultados

**D.**

	1						50
GreB <i>E. coli</i>	MKTPLV	TREG	YEK	LKQELNY	LWREERPEVT	KKVTWAASLG	DRSENADYQY
GreB <i>Salmonella</i>	MKTPLI	TREG	YEI	LKQELNY	LWREERPEVT	KKVTWAASLG	DRSENADYQY
Consensus	MKTPL!	TREG	YEKL	LKQELNY	LWREERPEVT	KKVTWAASLG	DRSENADYQY
	51						100
GreB <i>E. coli</i>	NKKRLREIDR	RVRYLTKCLE	NLKIVDYSPO	QEGKVFFGAW	VEIENDDGVT		
GreB <i>Salmonella</i>	NKKRLREIDR	RVRYLTKCME	NLKIVDYSPO	QEGKVFFGAW	VEIENDDGDR		
Consensus	NKKRLREIDR	RVRYLTKC\$E	NLKIVDYSPO	QEGKVFFGAW	VEIENDDGdr		
	101						150
GreB <i>E. coli</i>	hrFRIVGYDE	IFGRKDYISI	DSPMARALLK	KEVGLAVVN	TPAGEASWYV		
GreB <i>Salmonella</i>	LKFRIVGYDE	IFGRKDYISI	DSPMARALLK	KEVGLAVVN	TPVGEANWYV		
Consensus	hrFRIVGYDE	IFGRKDYISI	DSPMARALLK	KEVGLAVVN	TPaGEAnWYV		
	151						
GreB <i>E. coli</i>	NAIEYVKP						
GreB <i>Salmonella</i>	NAIEYVK.						
Consensus	NAIEYVK.						

! Aminoácido del grupo IV

\$ Aminoácido del grupo LM

**E.**

	1						50
<i>greB E. coli</i>	ATAACGTTCC	AGCAGCGCAC	GCAGGCGCAT	GTCGTCATCG	ACCACCAGAA		
<i>greB Salmonella</i>	ATAACGTTCC	AGTAGCGCC	GCAGACGCAT	ATCGTCATCA	ACCACCAGAA		
Consensus	ATAACGTTCC	AGcAGCGCaC	GCAGaCGCAT	aTCGTCATCa	ACCACCAGAA		
	51						100
<i>greB E. coli</i>	TCTTGTAGTT	CTCTTGCATT	GTTTGTACTC	CAAAGGTTTC	GCAACAAATT		
<i>greB Salmonella</i>	TCTTATAATT	CTCTTGCATT	GTCTGTACTC	CAAAGGTTTC	GCAACAAATT.		
Consensus	TCTTaTAaATT	CTCTTGCATT	GTctGTACTC	CAAAGGTTTC	GCAACAAaT.		
	101						150
<i>greB E. coli</i>	GTAAGCGTGT	ATTCTTAAAA	AAGCTCACGT	TCGTCACCAG	CTAAATCTGG		
<i>greB Salmonella</i>	GTAAGTGTGT	ATTCTTAAAA	AAGCTCACGT	GAGTCACCAG	CAAAATCTGG		
Consensus	GTAAGcGTGT	ATTCTTAAAA	AAGCTCACGT	gaGTCACCAG	CaAAaTCTGG		
	151						200
<i>greB E. coli</i>	TATGAATTTC	AGCCTAAATT	GTTACAAAGC	ATATTAACA	GCAGCTTAAG		
<i>greB Salmonella</i>	TATGAATTTC	AGGCTAAATT	GTTACAAAGC	ATATTAAACA	GCAGCTTAAA		
Consensus	TATGAATTTC	AGcCTAAATT	GTTACAAAGC	ATATTaACA	GCAGCTTAAA		
	201						250
	-10						-10
<i>greB E. coli</i>	TATACAATT	ATTCGGCGAA	AC.ATTATTG	ATTCTGTGA	TATGATC	CACG	
<i>greB Salmonella</i>	TATACAATT	AT.CGGCAAC	CCATTATTI	ATTCTGTGG	GACGATC	CACG	
Consensus	TATACAATTa	AT.CGGCaAa	aC.ATTATTg	ATTCTGTcGa	gAcGATC	CACG	
	251						297
<i>greB E. coli</i>	TTATACCCAA	TGTGCGCAAT	ATCAAACAGA	CAAAGGGAAT	CAACGAG		
<i>greB Salmonella</i>	TTATACCCCG	TGTGCGCAAT	ATCGA.CAGC	AAAGGTAAAT	CAACGAG		
Consensus	TTATACCCa	TGTGCGCAaT	ATCaA.CAGa	aAAAGGaAAT	CAACGAG		

**F.**

	1				50
<i>greB E. coli</i>	ATGAAAACGC	CCCTGGTTAC	CCGGGAAGGG	TATGAAAAAC	TCAAACAAGA
<i>greB Salmonella</i>	ATGAAAACGC	CCCTGAATCAC	CCGGGAAGGG	TACGAAACAC	TCAAACAAGA
Consensus	ATGAAAACGC	CCCTGaTcAC	CCGcGAAGGG	TAcGAAAaAC	TCAAACAAGA
	51				100
<i>greB E. coli</i>	GCTTAATTAT	CTCTGGCGTG	AAGAACGCCC	GGAGGTCACA	AAAAAGGTGA
<i>greB Salmonella</i>	GCTCAATTAT	CTCTGGCGTG	AAGACCGCCC	GGAGGTCACC	AAAAAAGTGA
Consensus	GCTcAATTAT	CTCTGGCGTG	AAGAAcGCCC	GGAGGTCACa	AAAAAAgTGA
	101				150
<i>greB E. coli</i>	CCTGGGCCGC	AAGTCTGGGC	GACCGCAGCG	AAAATGCTGA	CTATCAGTAT
<i>greB Salmonella</i>	CCTGGGCTGC	GAGTCTGGGC	GACCGCAGCG	AGAAATGCCA	CTATCAGTAT
Consensus	CCTGGGCcGC	aAGTCTGGGC	GACCGCAGCG	AaAATGccGA	CTATCAGTAT
	151				200
<i>greB E. coli</i>	AATAAAAAGC	GTCTGCGTGA	AATCGACCGT	CGCGTCCGCT	ATCTCACTAA
<i>greB Salmonella</i>	AATAAAAAGC	GCTGCGTGA	GATCGACAGA	CGCGTCAGAT	ATCTGACCAA
Consensus	AATAAAAAGC	GcCTGCGTGA	aATCGACaGa	CGCGTcaGaT	ATCTcACcAA
	201				250
<i>greB E. coli</i>	ATGCCTGGAA	AATCTCAAAA	TCGTGATTA	CTCCCCCAG	CAGGAAGGCA
<i>greB Salmonella</i>	ATGCATGGAA	AATCTCAAAA	TCGTGATTA	CTCCCCGAG	CAGGAGGGCA
Consensus	ATGCaTGGAA	AATCTCAAAA	TCGTGATTA	cTCCCCgAG	CAGGAaGGCA
	251				300
<i>greB E. coli</i>	AAGTCTTTT	TGGCGCTGG	GTGGAATTG	AAAACGACGA	TGGCGTGA
<i>greB Salmonella</i>	AAGTCTTCT	CGGCGCTGG	GTGGAATTG	AAAATGATGA	CGGCGATAGG
Consensus	AAGTCTTcT	cGGCGCcTGG	GTGGAaATTG	AAAAcGAcGA	cGGCGagAcG
	301				350
<i>greB E. coli</i>	CACCGTTTCC	GTATTGTCCG	CTACGATGAA	ATTTTGGCC	GTAAAGATTA
<i>greB Salmonella</i>	CTGAAGTTCC	GcATTGTCCG	CTACGATGAA	ATTTTGGAC	GTAAAGATTA
Consensus	CacaagTTCC	GcATTGTCCG	CTACGATGAA	ATTTTcGGAc	GTAAaGATTA
	351				400
<i>greB E. coli</i>	CATCTCTATC	GATTCCTCCGA	TGGCCCGCGC	ATTGCTGAAA	AAAGAAGTCG
<i>greB Salmonella</i>	CATCTCTATC	GAcTCGCTCCGA	TGGCCCGCGC	GCTACTGAAA	AAAGAAGTGG
Consensus	CATCTCTATC	GAcTcCcCCGA	TGGCcCGcGC	acTAcTgAAA	AAAGAAGTcG
	401				450
<i>greB E. coli</i>	GCGATCTGGC	GGTGGTGAAT	ACCCCTGCCG	GCGAAGCGAG	CTGGTATGTT
<i>greB Salmonella</i>	GCGATCTGGC	GGTGGTCAAC	ACCCCTGTCG	GCGAAGCAAA	CTGGTAcGTC
Consensus	GCGATCTGGC	GGTGGTcAAc	ACCCCTGcCG	GcGAAGCaAA	CTGGTAcGTC
	451		477		
<i>greB E. coli</i>	AATGCTATCG	AGTACGTGAA	ACCGTAA		
<i>greB Salmonella</i>	AATGCGATCG	AATACGTCAA	ATAA...		
Consensus	AATGcGATCG	AaTAcGTcAA	Acaa...		

**Figura 4.5.** Estudios *in silico* de las proteínas GreA y GreB, secuencias codificantes y regiones intergénicas de los genes *greA* y *greB* de *E. coli* (MG1655) y *Salmonella* (SL1344). En azul y fucsia se encuentran resaltados los aminoácidos y/o nucleótidos diferentes entre *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente. **A.** Alineamiento de proteínas GreA de *E. coli* y *Salmonella*. **B.** Alineamiento de las regiones intergénicas del gen *greA* de *E. coli* y *Salmonella*. En verde están resaltados los promotores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^E$  dependientes presentes en ambas especies bacterianas y en amarillo los nucleótidos +1 del inicio de la transcripción. **C.** Alineamiento de las secuencias codificantes del gen *greA* de *E. coli* y *Salmonella*. **D.** Alineamiento de proteínas GreB de *E. coli* y *Salmonella*. **E.** Alineamiento de las regiones intergénicas del gen *greB* de *E. coli* y *Salmonella*. En verde las regiones -10 predichas en *greB* de *E. coli*. **F.** Alineamiento de las secuencias



codificantes del gen *greB* de *E. coli* y *Salmonella*. Los alineamientos se realizaron con el software MultAlin y los porcentajes de identidad y similitud calculados con el software SIAS. La predicción de las regiones -10 del gen *greB* de *E. coli* se realizó con el software descrito por (Münch *et al.*, 2005).

Estos resultados indican que, aparte de la regulación conservada entre los genes *greA* y *greB* de *E. coli* y *Salmonella*, también existe una estructura conservada a nivel de proteína y a nivel de secuencia de ADN.

### 4.1.3 Análisis fenotípicos de las cepas mutantes para los factores Gre

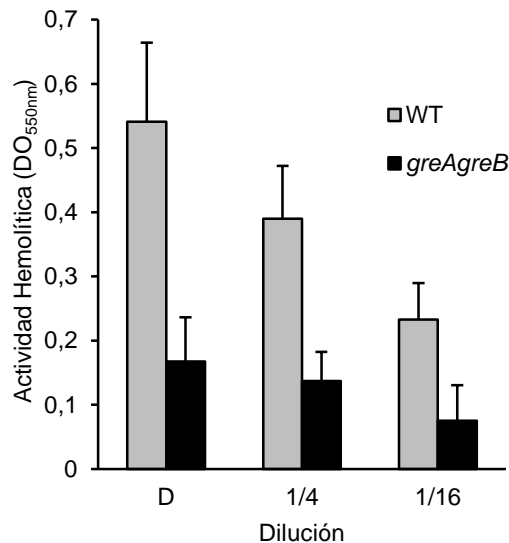
Se llevaron a cabo diferentes análisis fenotípicos en la cepa WT y la cepa *greA greB*, doble mutante para los factores Gre de *S. Typhimurium*. Para estos ensayos no se tuvieron en cuenta las mutantes simples *greA* y *greB* debido a que en estudios previos realizados en *E. coli* habrían puesto en manifiesto el papel redundante que ejercen ambas proteínas, de modo que la expresión de una proteína puede sustituir la función de la otra, haciendo que los mutantes simples muestren en la mayoría de los casos un fenotipo muy parecido al de la cepa salvaje (Stepanova *et al.*, 2007). Este limitado efecto de los mutantes simples *greA* y *greB* en *Salmonella* también ha sido detectado en este trabajo (ver apartados 4.2.1, 4.2.2, 4.3.2).

#### 4.1.3.1 Actividad Hemolítica

En *Salmonella*, la secreción de proteínas efectoras a través del T3SS juega un papel crucial en su patogenicidad. En condiciones de laboratorio se ha establecido que estas proteínas secretadas causan hemólisis de glóbulos rojos (Warawa *et al.*, 1999). Esta hemólisis es dependiente de la capacidad de las proteínas SipB, SipC y SipD para formar un poro en la membrana de los eritrocitos, provocando fugas de hemoglobina (Miki *et al.*, 2004). Para determinar la hemólisis, se incubaron sobrenadantes libres de células procedentes de cultivos de *Salmonella* con glóbulos rojos de oveja, y se determinó la absorbancia a 550nm del sobrenadante del cultivo, lo que permite detectar y cuantificar la presencia de hemoglobina liberada (Miki *et al.*, 2004). La capacidad de causar

hemólisis fue estudiada en diluciones seriadas de los sobrenadantes de la cepa WT y la cepa doble mutante *greAgreB*.

Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad hemolítica en la cepa doble mutante para los factores Gre de aproximadamente 3 veces al comparar con la cepa salvaje (WT) (figura 4.6).



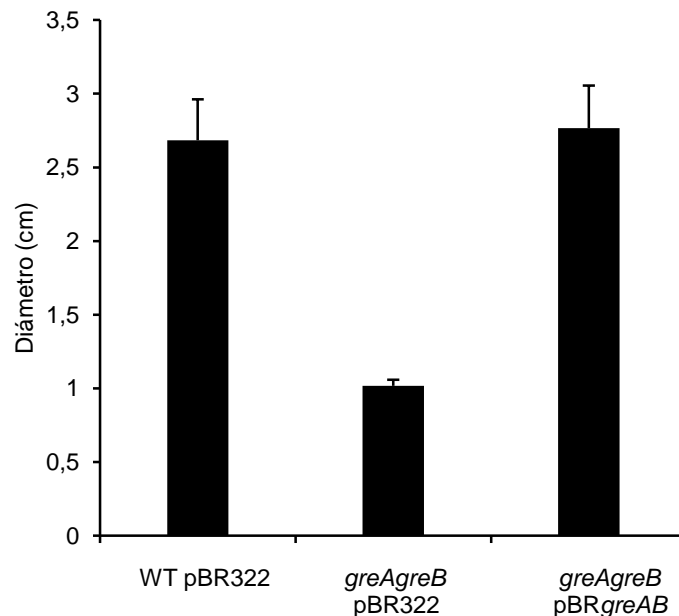
**Figura 4.6.** Actividad hemolítica de la cepa WT (SV5015) y la doble mutante *greAgreB* (TGC-3). Los cultivos bacterianos fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. La actividad hemolítica, definida como un aumento en la DO<sub>550nm</sub> del sobrenadante de la suspensión celular después de la infección, fue medida en tres muestras diferentes diluyendo la cantidad de bacterias. D: directa. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes.

Estos resultados indican que los factores Gre están implicados en la expresión y/o secreción de las proteínas responsables de causar la hemólisis y, por tanto, en la expresión de las proteínas Sip codificadas en la SPI-1. La implicación de los factores Gre en el control de la expresión de los genes de la SPI-1 ha sido estudiada en detalle en este trabajo (apartado 4.2).

#### 4.1.3.2 Motilidad

El sistema flagelar ha sido ampliamente involucrado en la patogenicidad de *Salmonella*. La motilidad juega un papel importante cuando *Salmonella* se encuentra en el exterior de la célula eucariota, ya que le permite nadar para entrar en contacto con las células susceptibles a ser invadidas (Schmitt *et al.*, 2001). Además, se requiere una estricta regulación del flagelo ya que debe reprimirse durante el crecimiento intracelular (Saini *et al.*, 2010).

Se realizaron estudios comparativos de *swimming*, movimiento a través de líquidos, entre la cepa WT y la cepa mutante para *greAgreB*, mediante crecimiento a 37 °C en placas de LB con 0,3 % de agar. Se obtuvo que la doble mutante *greAgreB* consigue en 16 h un desplazamiento de una distancia 2,5 veces menor que la cepa WT. Estos resultados fueron corroborados por complementación con el plásmido pBR*greAB* en el que se han clonado los genes *greA* y *greB* y se obtuvo la total complementación de la doble mutante a niveles de la cepa WT, sugiriendo que los factores Gre estarían afectando la motilidad en *Salmonella* (figura 4.7).



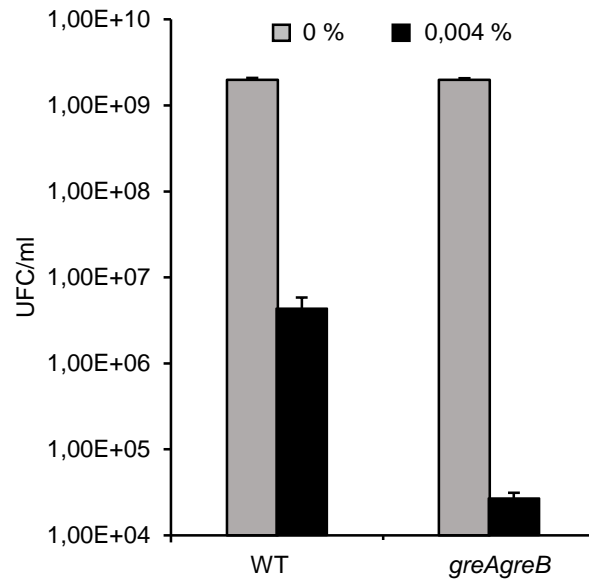
**Figura 4.7.** Ensayo de motilidad en las cepas WT (SV5015) y doble mutante *greAgreB* (TGC-3). A partir de estrías frescas crecidas en LB agar a 37 °C por 16 horas, se inocularon colonias en

placas de LB con 0,3 % de agar y se incubaron 6,5 horas a 37 °C. A continuación, se midió el recorrido realizado por las bacterias representado por un halo alrededor del lugar de inoculación, expresado como diámetro en centímetros (cm). Las barras representan la media y desviación estándar de 6 réplicas biológicas independientes.

#### 4.1.3.3 Resistencia al estrés oxidativo

El estrés oxidativo se genera debido a la presencia de moléculas prooxidantes en la célula que causan daño al ADN, ARN, proteínas y lípidos provocando en definitiva un importante efecto negativo en la fisiología de la célula, por lo cual, la capacidad de responder a un estrés oxidativo es crucial para la célula. Aunque las especies activas del oxígeno como los radicales libres y peróxidos, son producidas como un subproducto inevitable del metabolismo aeróbico normal, en condiciones normales son eliminadas del medio mediante la acción de diferentes enzimas.

Para determinar si los factores Gre podrían estar implicados en el control de la respuesta al estrés oxidativo se expusieron cultivos bacterianos al agente oxidante t-BOOH a una concentración final de 0,004 %. La cepa WT y la doble mutante *greA greB*, fueron sometidas a estrés oxidativo durante 1 hora a 37 °C. A continuación se analizó el número de células viables. En la figura 4.8 se observa una disminución importante en el número de células viables en la cepa doble mutante para los factores Gre en presencia de t-BOOH respecto a la cepa WT. Estos resultados sugieren que los factores Gre de *Salmonella* estarían de alguna manera implicados en el control de la respuesta al estrés oxidativo.



**Figura 4.8.** Resistencia al estrés oxidativo de las cepas WT (SV5015) y doble mutante *greAgreB* (TGC-3). Los cultivos bacterianos fueron crecidos en LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. A 2 ml de cultivo se les agregó el t-BOOH (tert-butyl-hidroperoxido) a una concentración final de 0,004 %. Como control se utilizaron cultivos en ausencia de t-BOOH (0 %). Las diferentes mezclas se incubaron durante 1 hora a 37 °C sin agitación. La viabilidad de las células después de la exposición al t-BOOH fue determinada como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml) sobre placas de LB. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 réplicas biológicas independientes.

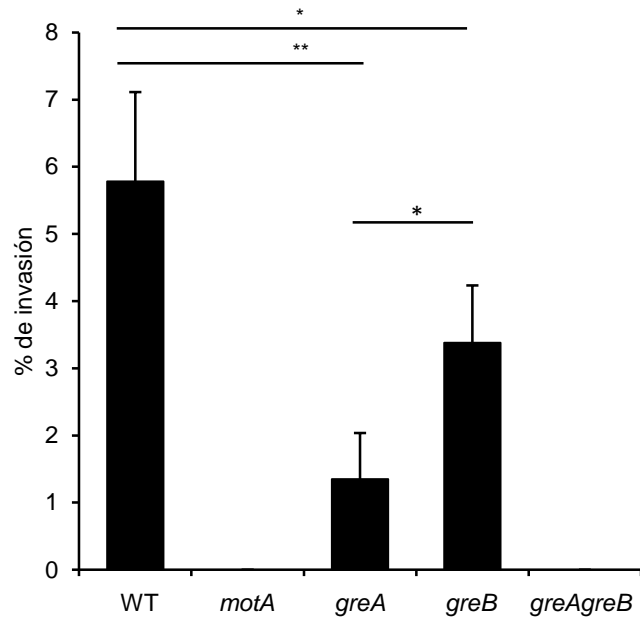
## 4.2 Papel de los factores Gre en la expresión de los genes presentes en la SPI-1

Los datos de actividad hemolítica sobre eritrocitos (apartado 4.1.3.1) indican que los factores Gre están implicados directa o indirectamente en el control de la expresión y/o secreción de las proteínas Sip de *Salmonella*. Las proteínas efectoras Sip, responsables de la hemólisis, se encuentran codificadas en la SPI-1 que codifica, a parte de las proteínas efectoras, para un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS). La SPI-1 media la invasión de células epiteliales por parte de *Salmonella*. Estudios previos en diferentes grupos de investigación han descrito que los genes presentes en la SPI-1 juegan un papel crucial en la patogenicidad de *Salmonella* (Ellermeier & Slauch, 2007) (Lara-Tejero & Galán, 2009) (Zhang *et al.*, 2002). En este apartado se estudia en detalle la regulación que ejercen los factores Gre en la expresión de los genes presentes en la SPI-1.

### 4.2.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en la invasión de células epiteliales

Las proteínas efectoras de la SPI-1 producen diferentes cambios fisiológicos en la célula hospedadora, induciendo un reordenamiento en el citoesqueleto de actina que lleva a la deglución de la bacteria (Zhou *et al.*, 2001). Se realizaron estudios de invasión de células epiteliales de la línea HT-29, utilizando cultivos de la cepa WT, los mutantes simples *greA* y *greB* y la doble mutante *greA greB*. A modo de control negativo se utilizó la cepa mutante en *motA*, que es incapaz de invadir las células epiteliales (Ahmad *et al.*, 2013).

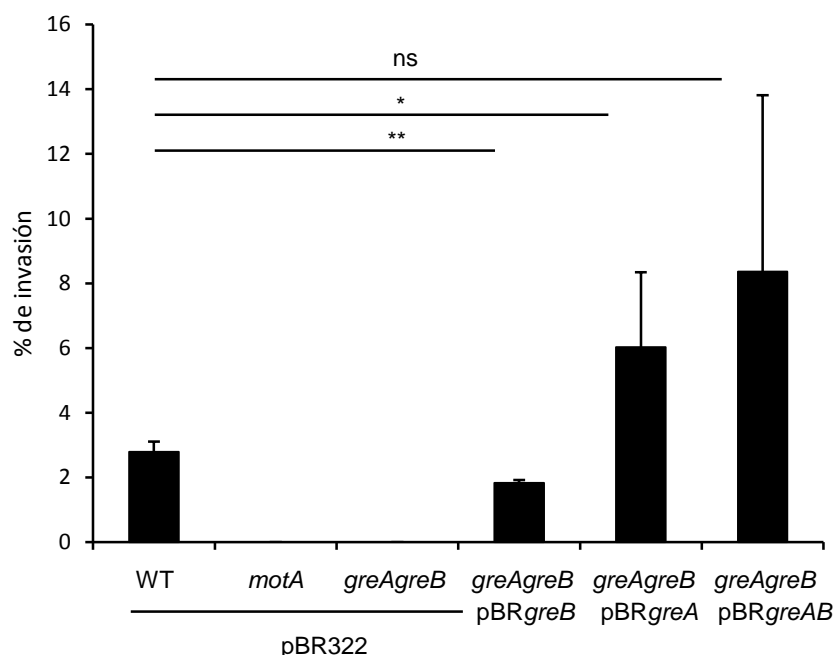
Los resultados mostrados en la figura 4.9, indican que las mutaciones simples *greA* y *greB* causan una disminución en la capacidad de *Salmonella* de invadir. También se observa que es más importante el efecto de la mutación *greA* que el de la mutación *greB*. Así la cepa mutante *greA* invade 4 veces menos que la cepa WT, mientras que la mutante *greB* presenta únicamente una reducción de 1,5 veces respecto a la cepa WT.



**Figura 4.9.** Porcentaje de invasión de las cepas WT (SV5015), *greA* (TGC-1), *greB* (TGC-2), *greAgreB* (TGC-3) y *motA* (TGC-42) crecidas en LB conteniendo 0,3 M de NaCl a 37 °C en estático hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,6. Cultivos confluentes de las células HT-29 fueron infectados con 100 µl de la suspensión bacteriana durante 1 hora. Posteriormente se eliminaron las bacterias extracelulares mediante incubación con gentamicina durante 1 hora. Las células HT-29 infectadas fueron lisadas con 1 % de Tritón™ X-100 y se realizaron diluciones seriadas para determinar la concentración de bacterias intracelulares. El porcentaje de invasión se calculó como el número de bacterias después de la infección dividido por el número de bacterias antes de la infección por 100. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas. Significancia estadística: \*p<0,05, \*\*p<0,01.

En la cepa doble mutante no se detectaron bacterias intracelulares indicando que la deficiencia de ambos factores Gre causa en *Salmonella* la incapacidad de invadir células epiteliales. Como es de esperar no se detectan bacterias intracelulares en la cepa *motA*. El porcentaje de invasión de la cepa salvaje, fue de aproximadamente un 6 %. La detección de un efecto mas importante en la cepa deficiente para ambos factores Gre en comparación con los mutantes simples, es consistente con trabajos previos realizados en *E. coli* que indican una redundancia funcional entre GreA y GreB (Stepanova *et al.*, 2007).

Para corroborar el efecto de la deficiencia de los factores Gre en la capacidad invasiva de *Salmonella*, se realizó un nuevo ensayo de invasión utilizando la cepa *greAgreB* conteniendo bien el plásmido pBR322 (vector control) o pBR*greA* (pBR322+*greA*) o pBR*greB* (pBR322+*greB*) o pBR*greAB* (pBR322+*greA*+*greB*). A modo de control también se utilizaron las cepas WT y *motA* conteniendo el plásmido pBR322. El fenotipo de invasión se recuperó en la cepa doble mutante al incorporar plásmidos conteniendo alguno de los genes que codifican para los factores Gre. Consecuentemente con los resultados previos, la complementación con el plásmido pBR*greAB* es la que presentó un mayor porcentaje de invasión (8,36 %) (Figura 4.10) y la menos evidente, que incluso no llega a los niveles de la cepa WT, se presentó con el plásmido pBR*greB* (1,83 %). Se ha de resaltar que la presencia del plásmido pBR322 causa una importante reducción en el porcentaje de invasión (comparar figuras 4.9 y 4.10). causado por la presencia de vectores de clonaje se ha descrito en estudios anteriores (Knodler *et al.*, 2005).



**Figura 4.10.** Porcentaje de invasión de las cepas WT (SV5015), *greAgreB* (TGC-3) y *motA* (TGC-42) con los plásmidos pBR322 (control) pBR*greA*, pBR*greB* y pBR*greAB*. Los cultivos bacterianos se crecieron en LB conteniendo 0,3 M de NaCl a 37 °C en estático hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,6. Cultivos confluentes de las células HT-29 fueron infectados con 100 µl de la suspensión bacteriana durante 1 hora. Posteriormente se eliminaron las bacterias extracelulares mediante



incubación con gentamicina durante 1 hora. Las células HT-29 infectadas fueron lisadas con 1 % de Tritón™ X-100 y se realizaron diluciones seriadas para determinar la concentración de bacterias intracelulares. El porcentaje de invasión se calculó como el número de bacterias después de la infección dividido por el número de bacterias antes de la infección por 100. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas. Significancia estadística: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns: no significativo.

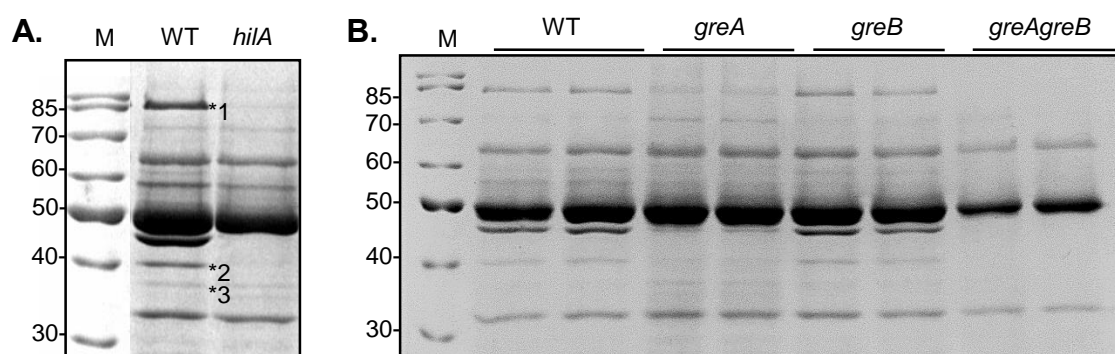
Estos resultados corroboran el análisis fenotípico que indicaba que los factores Gre son esenciales para la expresión de las proteínas efectoras codificadas en la SPI-1.

### **4.2.2 Efecto de los factores Gre en el perfil de proteínas secretadas de *Salmonella*.**

Los resultados previos obtenidos evidencian un posible papel de los factores Gre en la expresión de los genes SPI-1 y más concretamente en la producción y/o secreción de las proteínas Sip, por lo cual se realizaron experimentos para determinar si efectivamente así es el caso.

Se caracterizaron los perfiles de las proteínas secretadas (secretoma) en cultivos de la cepa WT y en los mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, en LB en fase estacionaria ( $DO_{600nm}$  de 2,0) a 37 °C en agitación. Estas condiciones al igual que el crecimiento en LB conteniendo 0,3 M de NaCl, son condiciones descritas para la inducción de la expresión de la SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008). A modo de control, se analizó el secretoma de la cepa mutante *hilA*. Se ha descrito que la delección del gen *hilA*, regulador directo de la mayoría de genes de la SPI-1, muestra un fenotipo equivalente a eliminar toda la isla de patogenicidad. Por lo que el fenotipo esperado es la ausencia de proteínas efectoras secretadas en el medio extracelular (Ellermeier *et al.*, 2005). Los extractos de proteínas secretadas fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior tinción con azul de Coomassie. En la figura 4.11 A se muestran los resultados. Al comparar el perfil proteico de la cepa WT y la mutante *hilA* se detectaron una serie de bandas presentes en WT y ausentes en *hilA* que

presumiblemente corresponden a las proteínas secretadas por el T3SS de la SPI-1. Atendiendo a su peso molecular estimado y a trabajos previos publicados, algunas de ellas pudieron ser atribuidas a las siguientes proteínas: 1. SipA 2. SipC y 3. SipD, descritas como proteínas efectoras secretadas por el T3SS y codificadas en la SPI-1 (Komoriya *et al.*, 1999) (Mizusaki *et al.*, 2008). Las proteínas SipA y SipC fueron confirmadas por medio del análisis por espectrometría de masas (LC/MS-MS, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). En la cepa mutante *greA* se observa una disminución importante de estas tres proteínas, lo que no ocurre en la cepa mutante *greB*. Por su parte, en la cepa doble mutante para los factores Gre, estas proteínas están ausentes. Estos resultados indican que GreA podría estar jugando un papel más importante en la secreción de proteínas efectoras que GreB. También parece que en ausencia de GreA, GreB puede mediar parte de la función biológica de GreA, ya que en ausencia de ambos factores se produce un fenotipo fuertemente afectado por la ausencia total de las proteínas efectoras, tal y como ocurre en la cepa mutante para *hilA*. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los ensayos de invasión de células epiteliales (apartado 4.2.1) y sugieren que los factores Gre juegan un papel importante en la correcta producción de proteínas Sip en el medio extracelular. Con los datos disponibles no podemos definir si el efecto de las mutaciones es a nivel de la producción de estas proteínas o de su secreción al medio extracelular.

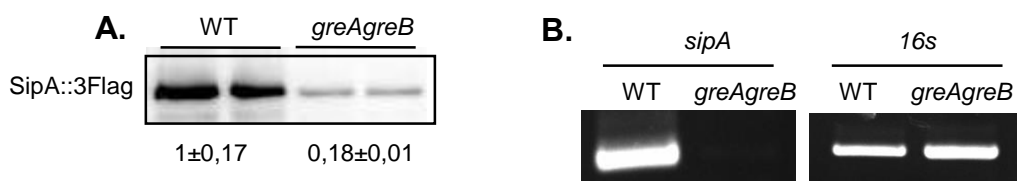


**Figura 4.11.** Perfil de proteínas secretadas (secretoma) de las cepas **A.** WT (SV5015) y *hilA* (CRIS-1). **B.** WT (SV5015), *greA* (TGC-1), *greB* (TGC-2) y *greAgreB* (TGC-3). Las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a partir de cultivos independientes, fueron filtrados para eliminar células residuales y las proteínas presentes se precipitaron con

## Resultados

TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD.

Estudios de inmunodetección de las proteínas efectoras fueron realizados para confirmar los resultados del secretoma de las diferentes cepas de *Salmonella*. Se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína SipA, utilizando la cepa MHS-2 derivada de SV5015, en la que la proteína SipA se expresa conteniendo una etiqueta 3Flag en el extremo carboxi-terminal (Hüttener *et al.*, 2014) (Uzzau *et al.*, 2001). La construcción génica que permite expresar SipA::3Flag fue transducida a la cepa doble mutante para los factores Gre, obteniendo la cepa *greAgreB sipA::3Flag*. Extractos totales (proteínas intracelulares y extracelulares) de las cepas WT y *greAgreB sipA::3Flag* fueron obtenidos a partir de cultivos independientes crecidos en LB a 37 °C y en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-Flag. Se obtuvo que la cantidad de proteína SipA está reducida en aproximadamente 5 veces en la cepa mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT (figura 4.12 A). Estos resultados confirman lo anteriormente mostrado en el secretoma, donde la cantidad de proteína SipA secretada al medio extracelular es prácticamente ausente en la cepa doble mutante para los factores Gre.

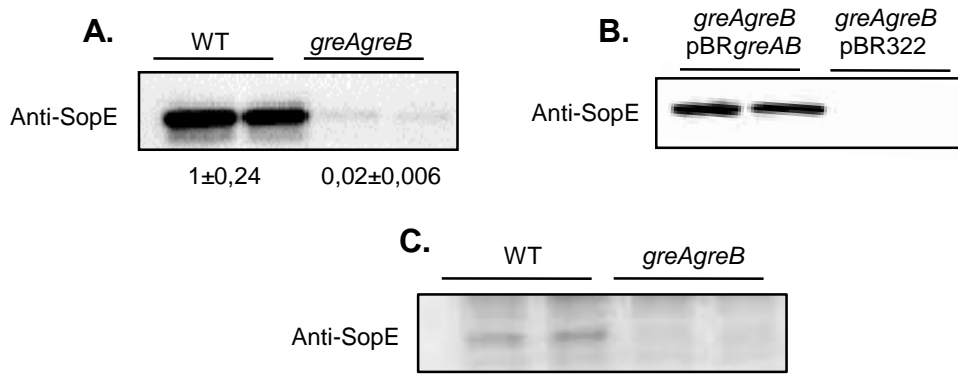


**Figura 4.12.** Los factores Gre juegan un importante papel en la producción de SipA. **A.** Inmunodetección de la proteína efectora SipA en extractos totales (proteínas intracelulares y extracelulares) obtenidos a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT *sipA::3Flag* (MHS-2) y *greAgreB sipA::3Flag* (TGC-16) crecidas en LB a 37 °C en agitación a una DO<sub>600nm</sub> de 2,0 tras ser inoculadas a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. La detección de las bandas se llevó a cabo

mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. La cuantificación fue realizada con el software Quantity one y es relativa a la cepa WT. **B.** Ensayo de RT-PCR del gen *sipA*. Las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) fueron crecidas como en **A**, se aisló ARN total y éste fue retrotranscrito a ADNc. La PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos sipAFor/sipARev y sall16s/sall116s para los genes *sipA* y *16s* (control), respectivamente. La cantidad de ADNc fue visualizado mediante una electroforesis en genes de agarosa al 2 % tras una tinción con bromuro de etidio.

Además, estos resultados indican que los factores Gre afectan a la producción de las proteínas efectoras, no únicamente a su secreción. Para determinar a qué nivel del proceso de expresión se encontraban afectando los factores Gre, se realizó un estudio de la expresión transcripcional de *sipA* mediante RT-PCR. Los resultados de RT-PCR muestran claramente que en la cepa doble mutante para los factores Gre la expresión del gen *sipA* se encuentra drásticamente reducida respecto a la cepa WT (figura 4.12 B). Estos resultados indican que los factores Gre están afectando la expresión transcripcional de *sipA* y presumiblemente otras proteínas efectoras secretadas por el T3SS de *Salmonella*.

También se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína SopE. Esta proteína no se encuentra codificada en la SPI-1, si bien es secretada mediante el T3SS presente en la isla y se ha descrito que su expresión y secreción se encuentra co-regulada con las proteínas efectoras codificadas en la SPI-1 (Hardt *et al.*, 1998). La inmunodetección de SopE se realizó a partir del sobrenadante y extractos celulares (proteínas intracelulares) de cultivos de las cepas WT y doble mutante *greAgreB*, utilizando el anticuerpo policlonal anti-SopE (Miroid *et al.*, 1999). En la figura 4.13 A, que corresponde a la inmunodetección de SopE a partir de sobrenadante precipitado de cultivo, se observa que en la cepa doble mutante *greAgreB* la cantidad de proteína SopE está reducida casi 50 veces con respecto a WT. Este importante efecto de los factores Gre fue confirmado por complementación con el plásmido pBR*greAB*, usando como vector control el plásmido pBR322 (figura 4.13 B).



**Figura 4.13.** Inmunodetección de la proteína efectora SopE a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) crecidas en LB a 37 °C en agitación a una  $DO_{600nm}$  de 2,0 tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. **A.** Sobrenadantes precipitados con TCA y **B.** para los experimentos de complementación, sobrenadantes de la cepa *greAgreB* (TGC-3) conteniendo el plásmido pBR*greAB* o pBR322 como vector control, fueron analizados. **C.** Extractos celulares de los cultivos crecidos en **A.** La detección de SopE se realizó con el anticuerpo policlonal anti-SopE. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. La cuantificación fue realizada con el software Quantity one y es relativa a la cepa WT.

En la figura 4.13 C, que corresponde a la inmunodetección a partir de extractos celulares, se observa que en la cepa WT la cantidad de proteína SopE intracelular es muy baja y en la cepa mutante *greAgreB* no se detecta su presencia. Estos resultados indican que la disminución de SopE secretada no se debe a una deficiente secreción, lo que causaría una acumulación en el citoplasma, si no que se debe a una deficiente expresión.

Estos resultados apoyan las conclusiones extraídas de los estudios sobre la proteína SipA, de que los factores Gre estarían actuando a nivel de la producción de las proteínas efectoras secretadas por el T3SS, y no exclusivamente en la secreción de las mismas.

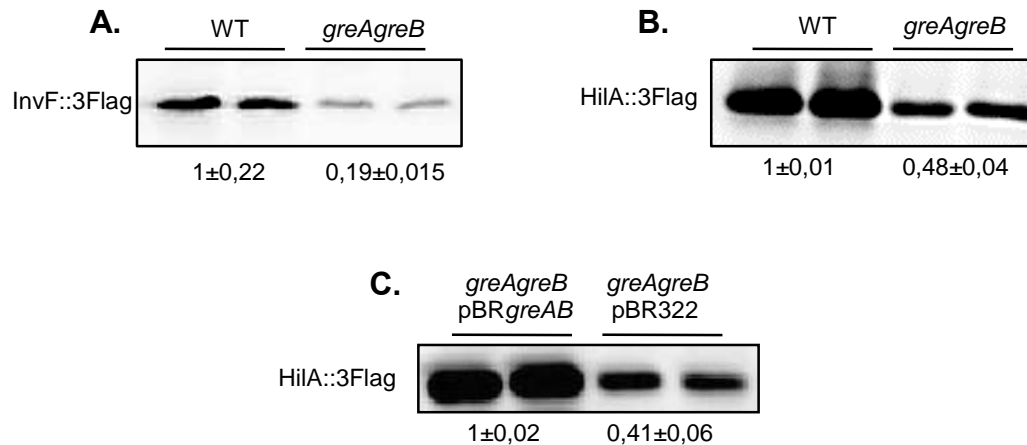
#### 4.2.3 Regulación de *hilA* mediada por los factores Gre

El gen *hilA* presente en la SPI-1, codifica para una proteína reguladora del mismo nombre que controla la expresión transcripcional de los genes de la SPI-1 necesarios para la invasión de células eucariotas. HilA activa la expresión de los

genes que codifican para todos los componentes del T3SS de la SPI-1, uniéndose directamente a los promotores de los operones *prg/org* e *inv/spa*, los cuales codifican para la maquinaria de secreción. De manera indirecta, HilA también controla la expresión de las proteínas efectoras al inducir la expresión del gen *invF*. La proteína InvF regula la expresión del operón *sic/sip* que codifica para las proteínas efectoras Sip cuya expresión se ha estudiado en apartados anteriores (Darwin & Miller, 2000) (Darwin & Miller, 2001). Como se comentó en la introducción, InvF puede actuar de forma independiente de HilA ya que su expresión puede ser activada por los tres reguladores de HilA - HilD, HilC y RtsA - de manera *hilA*-independiente a través de la interacción directa con un promotor alternativo de *invF* (Ellermeier & Slauch, 2003) (Akbar *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó estudiar el papel de los factores Gre en la expresión de las proteínas InvF y HilA. Para ello, se utilizaron las construcciones génicas *invF::3Flag* (TGC-20) y *hilA::3Flag* (JPTM7) (Bustamante *et al.*, 2008), que permiten expresar la proteína de interés con la etiqueta 3Flag en el extremo carboxi-terminal. Se obtuvieron cepas derivadas de SV5015, tanto WT como *greAgreB*, conteniendo estas construcciones génicas. A partir de extractos celulares obtenidos de cultivos independientes crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0, se realizó la detección con el anticuerpo monoclonal anti-Flag.

En la inmunodetección de InvF, se observó que la expresión de esta proteína se encuentra reducida en la cepa mutante *greAgreB*, 5 veces respecto a la cepa WT (figura 4.14 A). También se observó que en la cepa doble mutante *greAgreB* la cantidad de HilA se encuentra reducida 2 veces en comparación con la cepa WT (figura 4.14 B). El efecto de los factores Gre en la expresión de HilA se confirmó mediante ensayos de complementación con los plásmidos pBR*greAB* y pBR322. Se detectó que la cepa doble mutante *greAgreB* conteniendo el plásmido pBR*greAB* recuperó los niveles de HilA expresados en la cepa WT (figura 4.14 C).

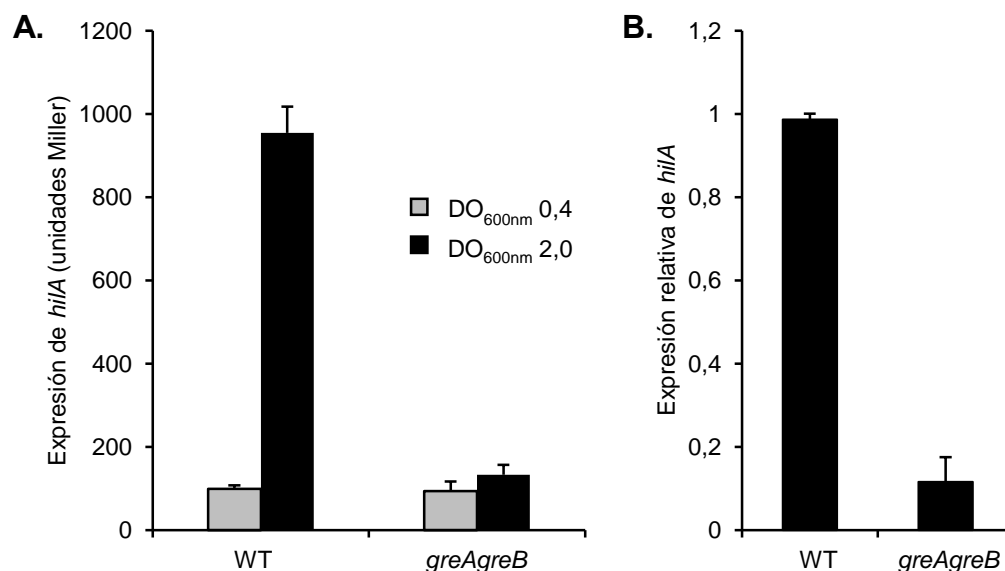


**Figura 4.14.** Efecto de los factores Gre en la expresión de los reguladores de los genes de la SPI-1, InvF y HilA. **A.** Inmunodetección de la proteína InvF en extractos celulares obtenidos de las cepas *invF::3Flag* (TGC-20) y *greAgreB invF::3Flag* (TGC-21). **B.** Inmunodetección de la proteína HilA en extractos celulares de las cepas WT *hilA::3Flag* (JPTM7), *greAgreB hilA::3Flag* (TGC-17) **C.** Inmunodetección de HilA en extractos celulares de la cepa *greAgreB hilA::3Flag* (TGC-17) conteniendo el plásmido pBR*greAB* o pBR322 como vector control. Para todos los estudios, dos cultivos independientes de las cepas fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación a una DO<sub>600nm</sub> de 2,0 tras ser inoculados a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. La cuantificación fue realizada con el software Quantity one y es relativa a la cepa WT.

Estos resultados sugieren que los factores Gre se requieren para la correcta expresión de las proteínas HilA e InvF. Atendiendo al modelo descrito de regulación de la SPI-1, los factores Gre podrían estar implicados directa o indirectamente en el control de la expresión del regulador HilA, como consecuencia se produciría una alteración en la expresión de InvF y el subsiguiente efecto en las proteínas efectoras.

Para profundizar en el efecto que tienen los factores Gre en la expresión del regulador de la SPI-1, HilA, se realizaron estudios transcripcionales del gen *hilA* mediante ensayos de determinación de la actividad β-galactosidasa con fusiones génicas *lacZ* (Miller, 1972). Para estos estudios se utilizó la cepa SV5015UB2 que contiene una fusión cromosómica *hilA::lacZ* (Baños *et al.*, 2009). Esta fusión *hilA::lacZ* fue transducida a la cepa doble mutante *greAgreB*. La determinación de la actividad β-galactosidasa se realizó en cultivos crecidos en LB a 37 °C en

agitación, hasta mitad de fase exponencial ( $DO_{600nm}$  de 0,4) o inicios de fase estacionaria ( $DO_{600nm}$  de 2,0). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.15 A. De acuerdo con datos previamente publicados, se observa una clara inducción de *hilA* en la cepa salvaje a inicios de fase estacionaria respecto a la expresión observada durante la fase de crecimiento exponencial (Bustamante *et al.*, 2008). En la cepa mutante *greAgreB*, sin embargo, no se produce esta inducción, indicando que los factores Gre estarían jugando un papel esencial en la regulación transcripcional de *hilA* y como consecuencia en la expresión de numerosos genes de la SPI-1. En fase estacionaria se observa una reducción en la expresión de *hilA* de aproximadamente 9 veces en la cepa mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT. Para corroborar estos resultados se realizaron ensayos de qPCR detectando directamente los niveles de transcrito de *hilA*. Se aisló ARN total a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 de las cepas WT y *greAgreB*. Se detectó una disminución de 10 veces en los niveles de transcripción de *hilA* en la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la WT (figura 4.15 B). Estos resultados confirman los experimentos anteriores y corroboran que los factores Gre son esenciales para la transcripción de *hilA*.



**Figura 4.15.** Efecto de los factores Gre en la expresión transcripcional del gen *hilA*. **A.** Expresión transcripcional mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas *hilA::lacZ* (SV5015UB2) y *greAgreB hilA::lacZ* (TGC-7) cultivadas en LB a 37 °C en agitación tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Los cultivos se crecieron hasta mitad de fase exponencial

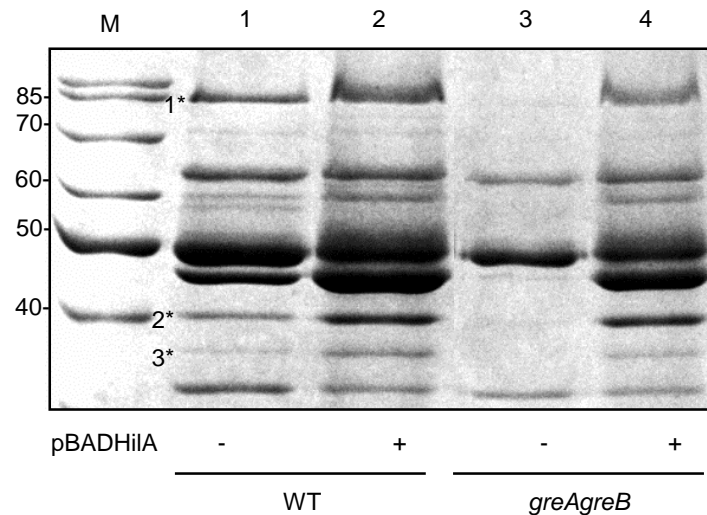


( $DO_{600nm}$  0,4) e inicio de fase estacionaria ( $DO_{600nm}$  2,0). Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una. **B.** Cuantificación relativa del ARNm de *hilA* en las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) cultivadas en LB a 37 °C en agitación tras ser inoculados a una  $DO_{600nm}$  de 0,001 hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Los análisis se realizaron mediante qPCR con la pareja de oligonucleótidos *hilA*qPCR1/*hilA*qPCR2. Los resultados fueron normalizados utilizando la detección del gen *gapA* (GAPDH) con la pareja de oligonucleótidos GAPDHqPCR1/GAPDHqPCR2, como control interno. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 3 réplicas técnicas cada una.

Atendiendo a su papel como factores implicados en la elongación de la transcripción y los resultados obtenidos que indican que los factores Gre estimulan la expresión de las proteínas efectoras y de su principal regulador, HilA, se plantearon dos posibles vías reguladoras: 1) los factores Gre afectan a la expresión de las proteínas efectoras únicamente debido a la modulación de la expresión de HilA o 2) a parte del efecto debido a los niveles de expresión de HilA, los factores Gre son también necesarios para la correcta transcripción de los genes que codifican para las proteínas efectoras.

Para diferenciar entre ambas posibilidades, se estudió el efecto de la expresión ectópica de HilA sobre la producción de proteínas secretadas en las cepas WT y doble mutante *greAgreB*. Para ello se clonó el gen *hilA* en el vector de expresión pBAD18 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (Guzman *et al.*, 1995), generando el plásmido pBADHilA (Hüttener *et al.*, 2014). Los extractos de proteínas secretadas se obtuvieron a partir de cultivos de las cepas WT y *greAgreB* conteniendo o no el plásmido pBADHilA crecidos en LB a 37 °C. Los cultivos para inducir la expresión de *hilA* del plásmido pBADHilA, se crecieron en presencia de 0,02 % de L-arabinosa.

Los resultados se muestran en la figura 4.16. El perfil proteico de WT cuenta con la presencia de las proteínas efectoras secretadas por el T3SS de la SPI-1 (SipA, SipC y SipD), en presencia o ausencia del plásmido pBADHilA (carriles 1 y 2).



**Figura 4.16.** Perfil proteico (secretoma) de las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) en presencia (carriles 2 y 4) y en ausencia (1 y 3) del plásmido pBADHilA. Las cepas fueron crecidas en LB con 100 µg/ml de carbamicilina a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. El plásmido pBADHilA fue inducido con 0,02 % de L-arabinosa. Los sobrenadantes obtenidos a partir de dos cultivos independientes, fueron filtrados y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas efectoras: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD.

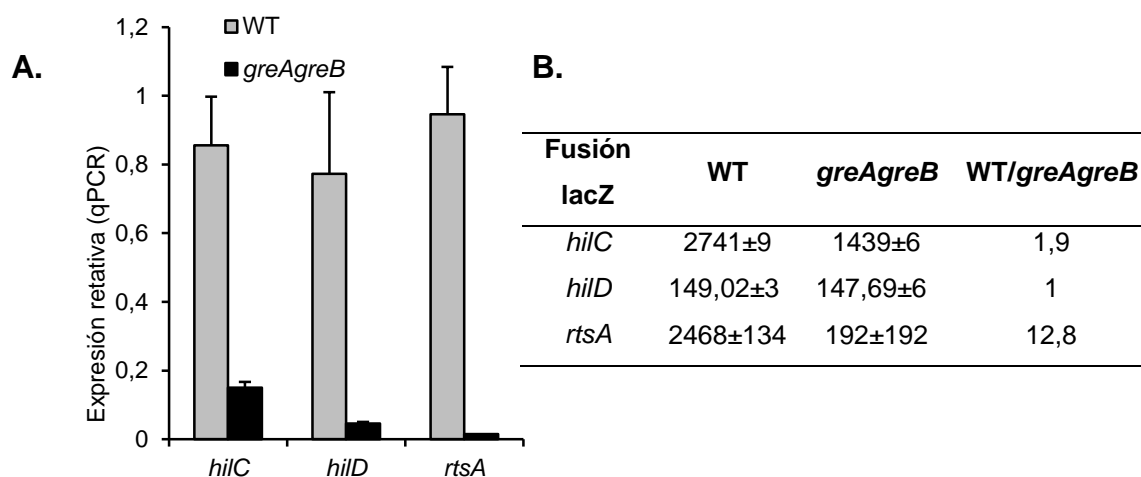
Cuando el plásmido pBADHilA está presente, las bandas 1, 2 y 3 presentan una mayor intensidad que en ausencia del plásmido, indicando que la expresión de las proteínas es HilA dependiente. En el caso de la cepa doble mutante *greAgreB*, en ausencia del plásmido pBADHilA (carril 3) se observa la falta de las proteínas efectoras Sip. No obstante, en presencia del plásmido pBADHilA en este fondo genético (carril 4) se observa que el perfil proteico recupera la presencia de las proteínas efectoras mostrando un perfil aparentemente idéntico al de la cepa WT.

Estos resultados indican claramente que la expresión ectópica de *hilA* causa una inducción de la expresión de las proteínas efectoras independientemente de la presencia de los factores Gre, lo que sugiere que estos no son esenciales para la transcripción de los genes que codifican para las proteínas efectoras. Estos

resultados sugieren un modelo en el que el impacto de los factores Gre sobre la invasión de *Salmonella* sería directa o indirectamente a través de la regulación de la expresión de HilA.

#### **4.2.4 Efecto de los factores Gre en HilD, HilC y RtsA, reguladores de la expresión de *hilA***

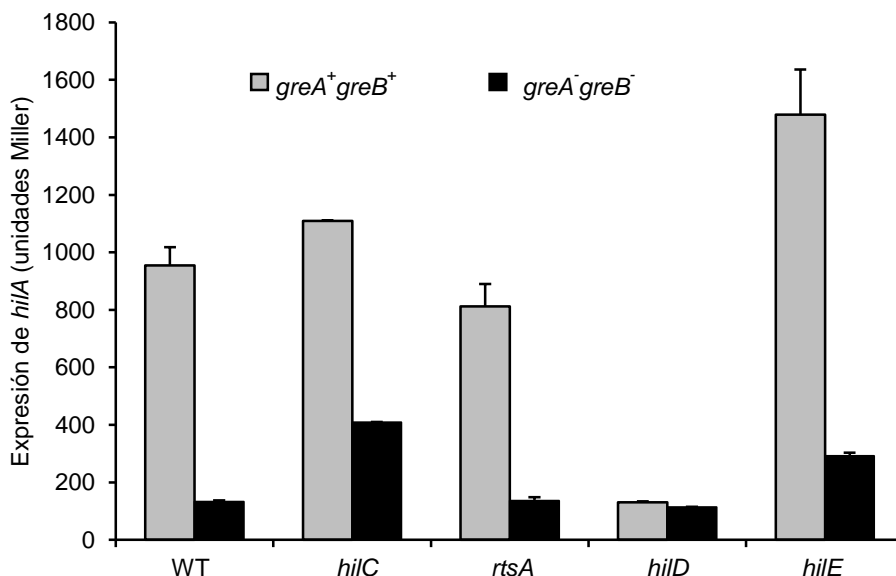
La expresión de *hilA* está modulada por la acción de tres activadores de la familia AraC: HilD, HilC y RtsA. Estas tres proteínas forman un bucle de regulación donde, a parte de activar la expresión de *hilA*, cada una es capaz de regular su expresión y promover la expresión de las otras dos. Con el objetivo de determinar si los factores Gre están actuando en algún punto de este bucle de regulación, se realizaron estudios transcripcionales mediante qPCR de la expresión de los genes *hilC*, *hilD* y *rtsA* en las cepas WT y doble mutante *greAgreB*. Para estos estudios se usaron muestras de ARN total obtenidas a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C de las cepas indicadas, hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Los resultados obtenidos (figura 4.17 A) muestran una disminución importante en la expresión de los tres genes, *hilC*, *hilD* y *rtsA*, en la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT. También se realizaron ensayos transcripcionales utilizando fusiones génicas entre *hilC*, *hilD* y *rtsA* y el gen *lacZ*. Para *hilC* y *rtsA* se detecta también una significativa disminución de la expresión en el mutante *greAgreB* en comparación con la cepa salvaje, si bien es de una forma menos pronunciada que con la qPCR (figura 4.17 B). Esto puede deberse a que en las cepas con las fusiones *lacZ* no hay producción de la proteína correspondiente, HilC y/o RtsA, y por tanto no hay autorregulación positiva. En el caso de la expresión de *hilD*, los ensayos con fusiones *lacZ* no muestran diferencias en el nivel de expresión de *hilD* entre WT y *greAgreB*. Este sorprendente resultado indica un contrasentido entre los datos derivados de qPCR y actividad  $\beta$ -galactosidasa. Como se relata más adelante, el esclarecimiento de esta supuesta incongruencia proporcionó información relevante sobre la acción de los factores Gre en la expresión de *hilD*.



**Figura 4.17. A.** Expresión transcripcional de los genes *hilC*, *hilD* y *rtsA*, evaluada mediante qPCR, en las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0, tras ser inoculados a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Se usaron las siguientes parejas de oligonucleótidos: *hilC*qPCR1/*hilC*qPCR2, *hilD*RTFW/*hilD*qPCRRV, *rtsA*ARTFW/*rtsA*ARTRV, respectivamente. Los resultados fueron normalizados utilizando la detección de *gapA* (GAPDH) con la pareja de oligonucleótidos GAPDHqPCR1/GAPDHqPCR2, como control interno. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 3 réplicas técnicas cada una. **B.** Valores absolutos del análisis transcripcional mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas *hilC::lacZ* (TGC-219), *greAgreB hilC::lacZ* (TGC-57), *hilD::lacZ* (TGC-25), *greAgreB hilD::lacZ* (TGC-26), *rtsA::lacZ* (TGC-58) y *greAgreB rtsA::lacZ* (TGC-59) cultivadas en LB a 37 °C en agitación tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Los cultivos fueron crecidos hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0.

Si bien, los resultados de qPCR indican que los factores Gre son necesarios para la correcta expresión de los genes *hilC*, *hilD* y *rtsA*. Se quiso determinar si alguno de los tres reguladores es una diana preferencial de los factores Gre. Para ello se planteó estudiar cómo se veía afectada la expresión de *hilA* en ausencia de cada uno de los reguladores, en un fondo genético tanto *greA<sup>+</sup>greB<sup>+</sup>* como *greA<sup>-</sup>greB<sup>-</sup>*. Con este fin, se obtuvieron mutantes mediante la técnica del reemplazamiento alélico para *hilC*, *hilD* y *rtsA* en las cepas SV5015UB2 (*greA<sup>+</sup>greB<sup>+</sup> hilA::lacZ*) y TGC-7 (*greA<sup>-</sup>greB<sup>-</sup> hilA::lacZ*). Los oligonucleótidos utilizados para la creación de los mutantes se detallan en la tabla 3.3. A continuación se realizaron ensayos transcripcionales en las cepas obtenidas crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Como se muestra

en la figura 4.18, en las condiciones experimentales usadas, HilC y RtsA no parecen ser relevantes para la expresión de *hilA*, ya que en las cepas mutantes para cada uno de los genes, el perfil de expresión de *hilA* es aparentemente idéntico al de la cepa WT.



**Figura 4.18.** Expresión transcripcional del gen *hilA* mediante ensayos de determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Las cepas con la fusión *hilA::lacZ*: SV5015UB2 y sus derivadas *greAgreB* (TGC-7), *hilC* (TGC-8), *greAgreB hilC* (TGC-9), *rtsA* (TGC-14), *rtsA greAgreB* (TGC-15), *hilD* (TGC-10), *greAgreB hilD* (TGC-11), *hilE* (TGC-12) y *greAgreB hilE* (TGC-13) fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0, tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

Sin embargo, la expresión de *hilA* disminuyó considerablemente en ausencia de *hilD*, en un fondo genético *greA*<sup>+</sup>*greB*<sup>+</sup>, mostrando unos niveles de expresión parecidos a los detectados en la cepa *greA*<sup>-</sup>*greB*<sup>-</sup>. Este resultado sugiere que *hilD* está jugando un papel fundamental en la activación de la expresión de *hilA*, y sugieren que los factores Gre podrían estar mediando la regulación de la SPI-1 a través de *hilD*.

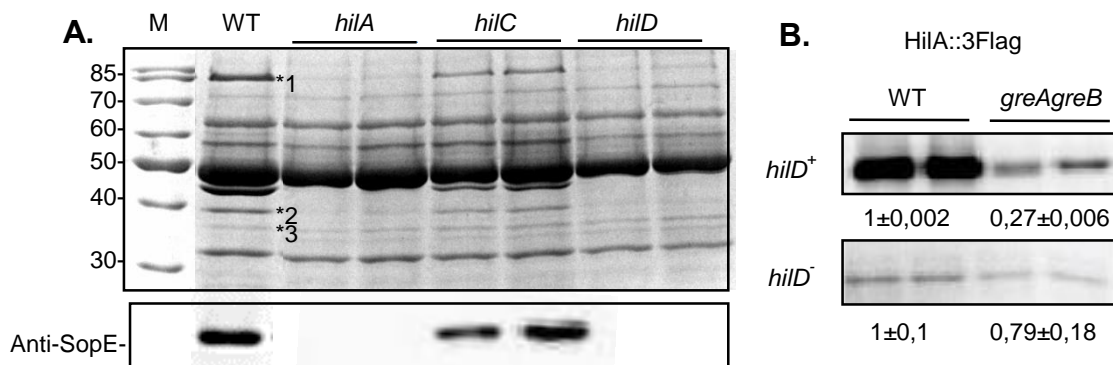
Se ha descrito un regulador negativo de HilD, la proteína HilE que es capaz de interactuar directamente con HilD causando su represión. Por tanto, uno podría plantear que quizás en las cepas mutantes para los factores Gre, se

podría producir un incremento en la producción de HilE, causando por tanto una reducción en los niveles de HilD activo. Esto tendría como consecuencia una menor expresión de HilA y de los genes codificados en la SPI-1. Para determinar si así es el caso, se realizó un experimento similar al previamente descrito utilizando una cepa mutante *hilE*. La expresión transcripcional de *hilA* en la cepa *greA<sup>+</sup>greB<sup>+</sup>hilE<sup>-</sup>* es más elevada que en la cepa *greA<sup>+</sup>greB<sup>+</sup>hilE<sup>+</sup>* (figura 4.18), siendo este el resultado esperable al ser HilE un regulador negativo de HilD. Por otro lado, se observa que la mutación *greA<sup>+</sup>greB<sup>-</sup>* causa una reducción en la cepa *hilE<sup>-</sup>* similar a la causada en la cepa *hilE<sup>+</sup>*, indicando que HilE no es un factor esencial en la regulación mediada por los factores Gre.

#### **4.2.5 HilD es la diana de la regulación, mediada por los factores Gre, de los genes de la SPI-1**

En trabajos previos se ha descrito el papel crucial de *hilD* en el control de la SPI-1 (Ellermeier *et al.*, 2005). En este trabajo se realizó un estudio del perfil proteico de la cepa mutante para el gen *hilD*, usando las cepas WT y *hilA* como controles. También se introdujo en este análisis la cepa mutante *hilC*. El secretoma fue analizado a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. Se observa que el perfil proteico de la cepa mutante para *hilD* es similar al de la cepa *hilA* (figura 4.19 A), es decir, ausencia de la secreción de proteínas SipA, SipC y SipD. Sin embargo, en la mutante *hilC* no se observan diferencias importantes respecto al perfil proteico de la cepa WT. También se realizó la inmunodetección específica de SopE en los extractos de proteínas secretadas. Los resultados concuerdan con las conclusiones extraídas del análisis del secretoma por tinción con Coomassie, indicando que en las condiciones experimentales utilizadas HilD juega un papel clave en el control de la expresión de los genes de la SPI-1 y genes corregulados. La necesidad de HilD para la correcta expresión de HilA se evaluó mediante la inmunodetección de HilA en extractos celulares de las cepas WT *hilA::3Flag* (JPTM7), *greA<sup>+</sup>greB<sup>-</sup>hilA::3Flag* (TGC-17) y sus derivadas *hilD: hilA::3Flag hilD* (TGC-18) y *greA<sup>+</sup>greB<sup>-</sup>hilA::3Flag hilD* (TGC-19). Los cultivos fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. La proteína HilA fue detectada en los extractos celulares de los

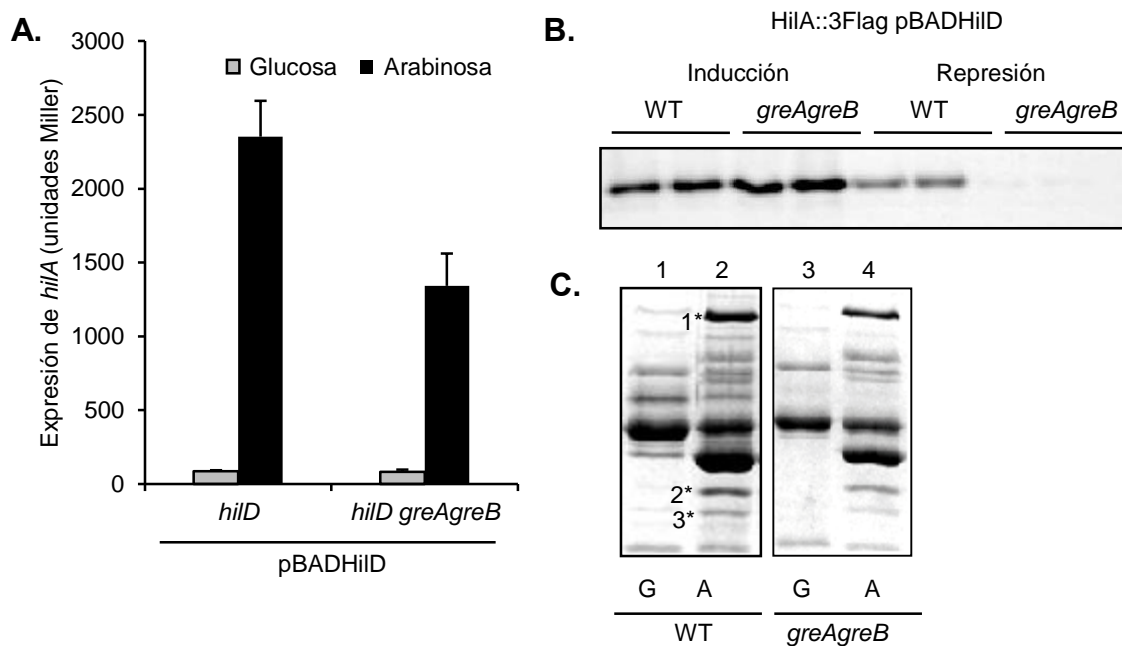
cultivos mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. Como se observa en la figura 4.19 B, hay una reducción importante de la cantidad de HilA intracelular en ausencia de los factores Gre en cepas *hilD*<sup>+</sup>. En el caso de las cepas *hilD*<sup>-</sup>, se observan niveles muy bajos de HilA tanto en la cepa *greA*<sup>+</sup>*greB*<sup>+</sup> como en la mutante *greA*<sup>-</sup>*greB*<sup>-</sup>. Estos resultados permitieron plantear un modelo en el que los factores Gre estarían regulando la expresión de los genes de la SPI-1 a través de HilD, lo que causa una concomitante regulación de la expresión de *hilA*.



**Figura 4.19.** El efecto de los factores Gre se observa únicamente en un fondo genético *hilD*<sup>+</sup>. **A.** Perfil proteico (secretoma) e inmunodetección de SopE en las cepas WT (SV5015), *hilA* (CRIS-1), *hilC* (MHQ-2) y *hilD* (MHQ-3) crecidas en LB a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. Los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD. La detección de SopE se realizó con el anticuerpo policlonal anti-SopE. **B.** Inmunodetección de HilA en extractos celulares a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT *hilA*::3Flag (JPTM7), *greAgreB hilA*::3Flag (TGC-17), *hilD hilA*::3Flag (TGC-18) y *greAgreB hilD hilA*::3Flag (TGC-19). Todas las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0 tras ser inoculadas a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. En A y en B la detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. La cuantificación fue realizada con el software Quantity one y es relativa a la cepa WT.

Para profundizar en la regulación mediada por los factores Gre de HilD y su impacto en los genes de la SPI-1, se estudió la expresión transcripcional del gen *hilA* mediante la fusión génica *hilA*::*lacZ*, en cepas mutantes para *hilD* bajo la

expresión ectópica de HilD (presencia del plásmido pBADHilD). Para ello, primero se clonó el gen *hilD* en el vector de expresión pBAD18 generando el plásmido pBADHilD. La expresión de *hilA::lacZ* fue determinada en las diferentes cepas crecidas en medio LB, en condiciones de expresión de HilD al añadir L-arabinosa (0,02 %), o no expresión al añadir glucosa (0,45 %). Como se observa en la figura 4.20 A, la expresión ectópica de HilD, en cepas carentes del gen *hilD* cromosómico, permitió recuperar la expresión del gen *hilA*, tanto en una cepa WT como mutante para los factores Gre.



**Figura 4.20.** La expresión ectópica de HilD confirma que la regulación de la SPI-1 por parte de los factores Gre es mediada por HilD. **A.** Expresión transcripcional del gen *hilA* mediante ensayos de determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en cultivos de las cepas *hilD* (TGC-10), *hilD greAgreB* (TGC-11) en presencia del plásmido pBADHilD. Los cultivos fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0, en presencia de glucosa (0,45 %) o L- arabinosa (0,02 %). Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una. **B.** Inmunodetección de HilA en extractos celulares a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT *hilA::3Flag* (JPTM7) y *greAgreB hilA::3Flag* (TGC-17). Todas las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. **C.** Perfil proteico (secretoma) de las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) en presencia del plásmido pBADHilD en cultivos en LB en presencia de glucosa (G) (0,45 %) en los carriles 1 y 3 (no



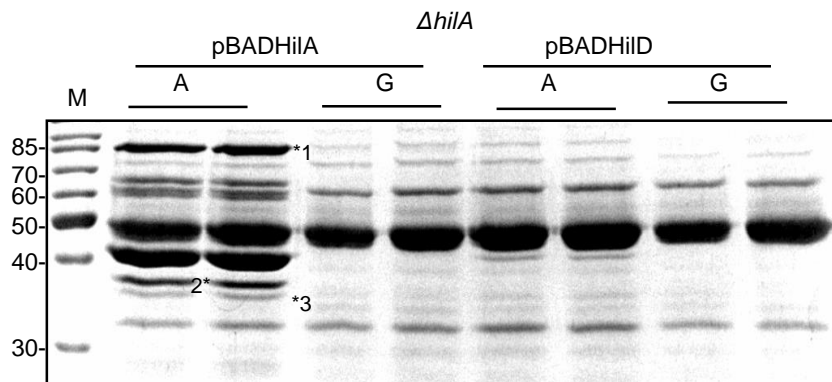
inducción de *hilD*) o en presencia de L- arabinosa (A) (0,02 %) en los carriles 2 y 4 (inducción de *hilD*). Los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD.

La exclusiva dependencia de la expresión de *hilA* por la presencia de HilD independientemente de la presencia de los factores Gre fue confirmada mediante la inmunodetección de HilA en cepas *hilD*<sup>+</sup> en presencia del plásmido pBADHilD (figura 4.20 B). La expresión de HilA se observa en cantidades similares en las cepas WT y *greAgreB* cuando la expresión de HilD es inducida desde pBADHilD con L-arabinosa.

También se realizó un análisis de secretomas de cultivos donde HilD fue sobreexpresado en las cepas WT y mutante *greAgreB*. Los secretomas se realizaron a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0, de las cepas WT y *greAgreB* conteniendo el plásmido pBADHilD. La expresión de *hilD* desde el plásmido pBADHilD fue inducida y reprimida en las mismas condiciones explicadas en el párrafo anterior. La expresión ectópica de HilD causa un aumento en la producción de proteínas secretadas en las cepa WT así como en la cepa doble mutante *greAgreB* (figura 4.20 C). Estos datos indican que la presencia de HilD es suficiente para la correcta expresión de proteínas efectoras en ausencia de los factores Gre, sugiriendo que los factores Gre no son estrictamente necesarios para la expresión de HilA y las proteínas efectoras.

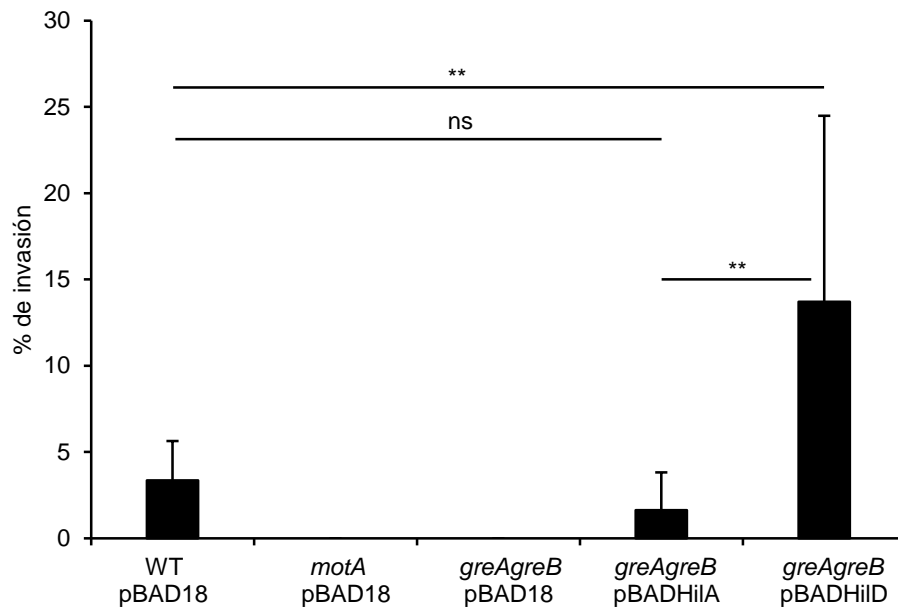
Los resultados mostrados en las figura 4.19 y 4.20 confirman que HilD es necesaria para la expresión de HilA y hasta el momento hemos descrito que la regulación que ejercen los factores Gre sobre la SPI-1 es mediada posiblemente a través de HilD. Atendiendo a que hay vías de inducción de proteínas efectoras independientes de *hilA*, para demostrar que la regulación mediada por HilD requiere la presencia de *hilA*, se realizó un estudio del secretoma de la cepa mutante para *hilA* en presencia de los plásmidos pBADHilA o pBADHilD. En la figura 4.21 se observa que cuando se induce la expresión de HilA desde el

plásmido pBADHilA en la cepa *hilA*<sup>-</sup>, el perfil proteico es similar al de una cepa WT. En el caso de la inducción de la expresión de HilD desde el plásmido pBADHilD, se observa que en ausencia de *hilA* cromosómico, la sobreexpresión de HilD no es capaz de recuperar la secreción de las proteínas efectoras. Estos resultados indican que para que exista la regulación de HilD sobre la SPI-1, es necesario que *hilA* esté presente.



**Figura 4.21.** Perfil proteico (secretoma) de la cepa *hilA* (CRIS-1) en presencia de los plásmidos pBADHilA o pBADHilD en cultivos en LB en presencia de glucosa (G) (no inducción *hilA* o *hilD*) o en presencia de L- arabinosa (A) (inducción de *hilA* o *hilD*). La inducción de los genes *hilA* y *hilD* de los respectivos plásmidos se realizó añadiendo 0,02 % de L-arabinosa. La no inducción del gen *hilA* se realizó añadiendo 0,2 % de glucosa y la de *hilD* con 0,45 % de glucosa. Los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD.

Se realizaron ensayos de invasión de células de la línea HT-29 utilizando cultivos de la cepa *greAgreB* en condiciones de sobreexpresión de HilA y HilD al contener los plásmidos pBADHilA y pBADHilD. A modo de control también se utilizó la cepa *greAgreB* conteniendo el plásmido pBAD18, así como la cepa WT y la cepa *motA* conteniendo el mismo plásmido. En la cepa WT con el plásmido pBAD18 se obtuvo aproximadamente un 3 % de invasión (figura 4.22).



**Figura 4.22.** Porcentaje de invasión las cepas WT (SV5015), *greAgreB* (TGC-3) y *motA* (TGC-42) con los plásmidos pBAD18 (control), pBADHilA y pBADHilD, inducidos con 0,02 % de arabinosa. Las cepas fueron crecidas en LB conteniendo 0,3 M de NaCl con 100 µg/ml de carbamicilina hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,6 a 37 °C en estático. Cultivos confluentes de las células HT-29 fueron infectados con 100 µl de la suspensión bacteriana durante 1 hora. Posteriormente se eliminaron las bacterias extracelulares mediante incubación con gentamicina. Las células HT-29 infectadas fueron lisadas con 1 % de Tritón™ X-100 y se realizaron diluciones seriadas para determinar la concentración de bacterias intracelulares. El porcentaje de invasión se calculó como el número de bacterias después de la infección dividido por el número de bacterias antes de la infección por 100. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas. Significancia estadística: ns: no significativo, \*\*p<0,01.

En la cepa *motA* y en la doble mutante *greAgreB* en presencia del plásmido pBAD18 no se detectó invasión como era de esperar atendiendo a resultados previos (figuras 4.9 y 4.10). Por su parte, la inducción de *hilD* en la cepa doble mutante *greAgreB*, recuperó significativamente la capacidad de invadir, siendo el porcentaje de invasión de aproximadamente 5 veces los detectados en la cepa WT con el plásmido pBAD18. Sorprendentemente, cuando se indujo la expresión de *hilA* en la cepa doble mutante *greAgreB* con el plásmido pBADHilA, el nivel de invasión detectado fue similar al de la cepa WT con pBAD18. Esto podría

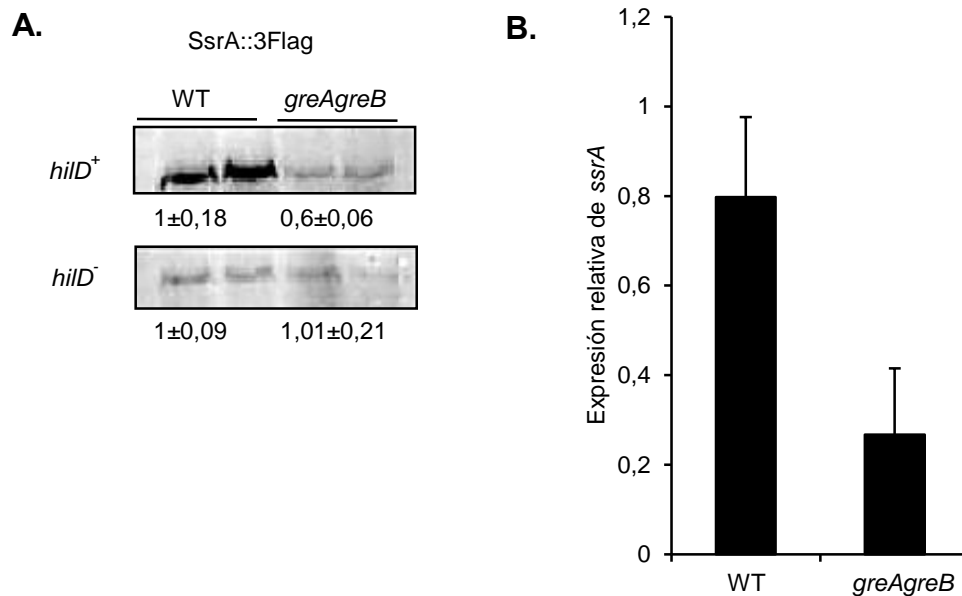
indicar la existencia de factores esenciales para la invasión, que son *hilD*-dependientes pero *hilA*-independientes.

#### 4.2.6 Regulación de la SPI-2 mediante los factores Gre a través de HilD

Trabajos previos han descrito un “*cross talk*” entre la regulación de la SPI-1 y la SPI-2 de *Salmonella*. El regulador central de la SPI-2 es el sistema de dos componentes SsrA/SsrB. SsrA, una proteína integral de membrana y SsrB, se une a los promotores de los genes pertenecientes a la SPI-2, desencadenando la correcta expresión de la maquinaria del T3SS y las proteínas efectoras de la SPI-2 (Walthers *et al.*, 2007) (Worley *et al.*, 2000). H-NS reprime *ssrAB* uniéndose a varios sitios ubicados en una región que abarca el promotor y parte de la secuencia aguas abajo (región -55/+287), formando un complejo que bloquea el acceso de la ARN polimerasa al promotor de *ssrAB*. HilD es necesaria para la expresión del operón *ssrAB* en presencia de H-NS al unirse a la región -55/+240 y desplazar a H-NS permitiendo la expresión de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008) (Martínez *et al.*, 2014). En este trabajo se planteó estudiar si la existencia de una regulación de *hilD*, mediada por los factores Gre, podría tener un impacto en la expresión de la SPI-2 al afectar la expresión de *ssrA*. Para ello, se realizaron ensayos de inmunodetección de SsrA en cultivos de las cepas: *ssrA::3Flag* (JPTM8), *greAgreB ssrA::3Flag* (TGC-22), *hilD ssrA::3Flag* (TGC-23) y *greAgreB hilD ssrA::3Flag* (TGC-24) crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. La proteína SsrA fue detectada en los extractos celulares de los cultivos mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. Como se observa en la figura 4.23 A, hay una reducción importante de la cantidad de SsrA intracelular en la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT. También se observa una disminución drástica de SsrA en las cepas *hilD*, independientemente de la presencia o no de los factores Gre.

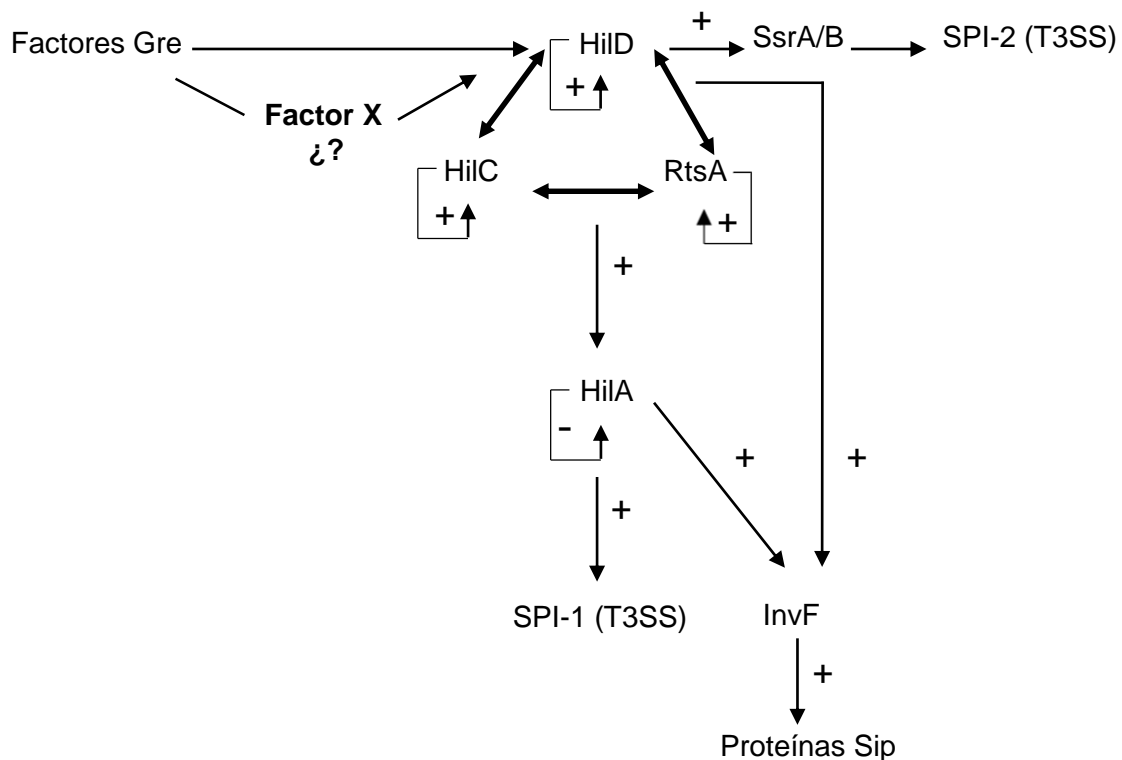
Ensayos transcripcionales mediante qPCR fueron realizados para detectar los niveles del transcrito de *ssrA*. Se aisló ARN total a partir de cultivos crecidos en las mismas condiciones. Se observó una disminución de los niveles de expresión de *ssrA* en la cepa doble mutante *greAgreB* en comparación con la cepa WT

(figura 4.23 B). Estos resultados estarían indicando que la regulación de *hilD* mediada por los factores Gre tiene un impacto en la expresión de la SPI-2.



**Figura 4.23.** Los factores Gre regulan la expresión de la SPI-2 a través de HilD. **A.** Inmunodetección de SsrA intracelular en extractos celulares a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT *ssrA*::3Flag (JPTM8), *greAgreB* *ssrA*::3Flag (TGC-22), *hilD* *ssrA*::3Flag (TGC-23) y *greAgreB* *hilD* *ssrA*::3Flag (TGC-24). Las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0 tras ser inoculadas a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL. La cuantificación fue realizada con el software Quantity one y es relativa a la cepa WT. **B.** Expresión transcripcional del gen *ssrA*, evaluada mediante qPCR, en las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0 en agitación tras ser inoculados a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001. Se usó la pareja de oligonucleótidos: *ssrA*qPCR1/*ssrA*qPCR2. Los resultados fueron normalizados utilizando la detección de *gapA* (GAPDH) con la pareja de oligonucleótidos GAPDHqPCR1/GAPDHqPCR2, como control interno. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 3 réplicas técnicas cada una.

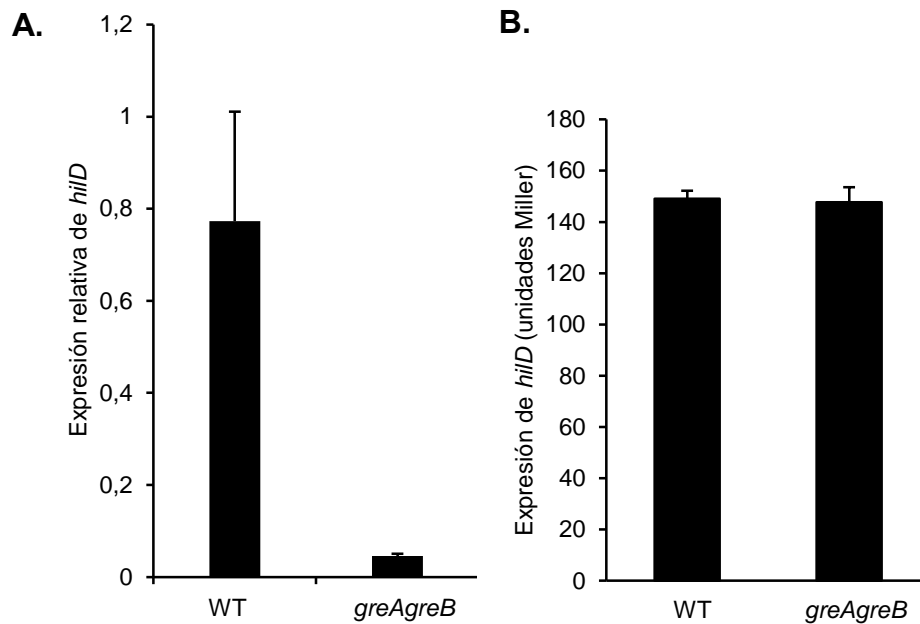
Los resultados obtenidos en relación al papel de los factores Gre en la regulación de la patogenicidad de *Salmonella*, se resumen en la figura 4.24 donde se representa el papel de los factores Gre en el control de la expresión de HilD.



**Figura 4.24.** Modelo de regulación de la patogenicidad de *Salmonella* a través de los factores Gre. HiIA es el regulador directo de la SPI-1 que codifica para las proteínas efectoras. HiIA está regulado por un bucle de regulación comprendido por las proteínas HiID, HiIC y RtsA. El operón SsrA/B es el regulador de la expresión de la SPI-2. En este trabajo se plantea que los factores Gre juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes codificados en la SPI-1 y SPI-2 a través de la regulación de *hilD*.

#### 4.2.7 Mecanismo de regulación de la expresión de HiID mediado por los factores Gre

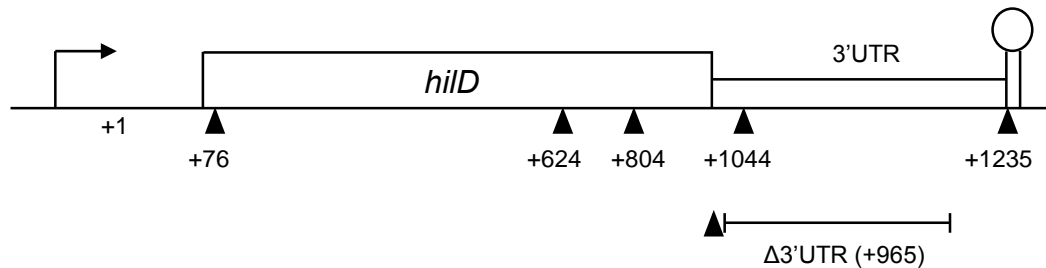
En secciones previas de este trabajo se mostró mediante qPCR el efecto de los factores Gre en la expresión transcripcional de los genes *hilC*, *hilD* y *rtsA*, así como mediante fusiones génicas de los genes *hilC*, *hilD* y *rtsA* (figura 4.17 A y B). Se observó una clara discrepancia en el efecto de los factores Gre en la expresión de *hilD* dependiendo de la metodología utilizada (figura 4.25). Hubo una clara reducción de los niveles de ARNm de *hilD* (qPCR), que no se tradujo en una disminución en la actividad  $\beta$ -galactosidasa derivada de una fusión transcripcional *hilD::lacZ* en el cromosoma.



**Figura 4.25.** Efecto de los factores Gre en la expresión transcripcional del gen *hilD*. Ver figura 4.17 para detalles.

Esta incongruencia en los resultados de expresión transcripcional dependiendo de la metodología utilizada (qPCR y fusiones con *lacZ*) podría deberse a la posición en que se ha colocado la fusión génica en el gen *hilD* (posición +76). Es bien sabido que *hilD* se encuentra autorregulado positivamente. La fusión génica utilizada (+76) no permitía expresar la proteína HilD y por lo tanto, se habría eliminado el fenómeno de autorregulación. Además, López-Garrido *et al* (2014) describieron que la región 3'UTR (del inglés 3' *untranslated region*) del gen *hilD* puede jugar un papel importante en la regulación de *hilD* y en consecuencia de los genes de la SPI-1. Vieron que en ausencia de esta región 3'UTR, los niveles del ARNm de *hilD* aumentaban y consecuentemente los niveles de expresión de los genes presentes en la SPI-1. Teniendo en cuenta que la fusión génica utilizada carecía de la secuencia codificante y la región 3'UTR, se realizaron experimentos para determinar si estos módulos eran importantes para la acción reguladora de los factores Gre en la expresión transcripcional de *hilD*.

Se construyeron fusiones génicas en diferentes puntos del gen *hilD* incluyendo o no, la secuencia codificante y la región 3'UTR. En la figura 4.26 se muestra un esquema de la localización en el gen *hilD* de las fusiones con el gen *lacZ*, realizadas mediante la recombinasa FLP.



**Figura 4.26.** Esquema de la localización en el gen *hilD* de las fusiones cromosómicas con el gen *lacZ* (triángulos negros). También se indica la secuencia eliminada en la cepa mutante por deleción Δ3'UTR y el lugar donde posteriormente se introdujo la fusión con el gen *lacZ* (+965) (López-Garrido *et al.*, 2014). Para la realización de las fusiones génicas, se llevó a cabo primero el protocolo de reemplazamiento alélico descrito por Datsenko & Wanner (2000) y posteriormente se introdujeron las fusiones *lacZ* con el plásmido pKG136 (Ellermeier *et al.*, 2002).

En la figura 4.27 se presenta la secuencia codificante de *hilD*, más la región 3'UTR. Se indican además las posiciones de los oligonucleótidos usados en el protocolo de reemplazamiento alélico y las posiciones exactas en las que se realizaron las fusiones con el gen *lacZ*, descritos en la tabla 3.3. El número de cada fusión fue asignado contando aguas abajo a partir del nucleótido +1 de inicio de transcripción.



## Resultados

```

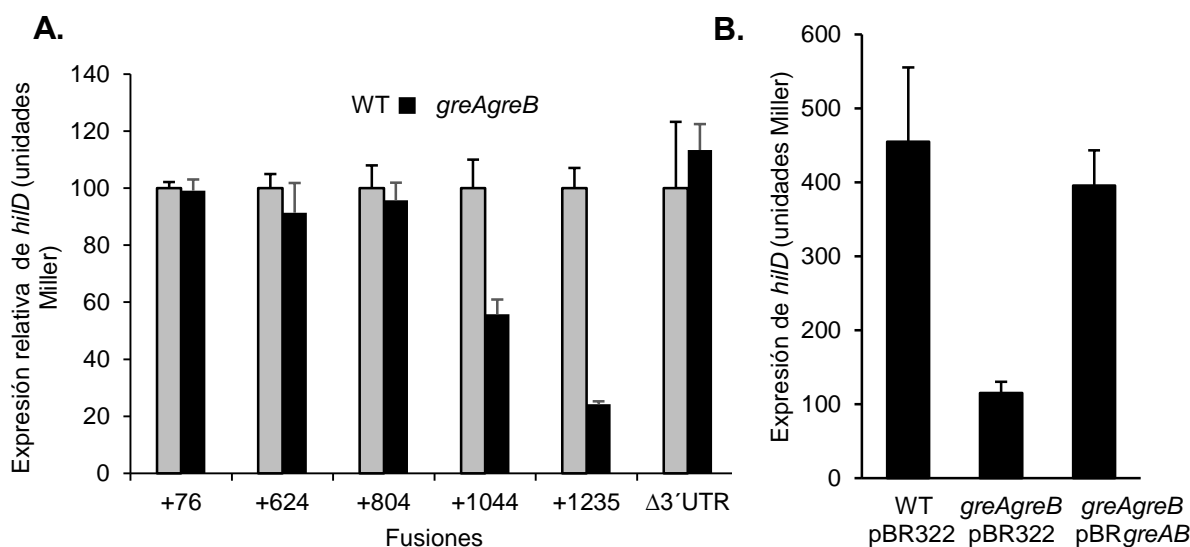
1 GACCATTGCC AACACACGCT AATAAAGAGC ATTTACAACT CAGATTTTTT CAGTAGGATA
      +1
61 CCAGTAAAGGA ACATTAAAAAT AACATCAACA AAGGGATAAT ATGGAAAATG TAACCTTTGT
121 AAGTAATAGT CATCAGCGTC CTGCCGCAGA TAACCTTACAG AAATTTAAAAAT CACTTTTGAC
      +76
181 AAATACCCGG CAGCAAATTA AAAGTCAGAC TCAGCAGGTT ACCATCAAAA ATCTTTATGT
241 AAGCAGTTTC ACTTTAGTTT GCTTTCGGAG CCGTAAACTG ACGATTAGCA ATAATCACGA
301 TACGATTTAC TGTGACGAAC CTGGGATGTT GGTGCTCAAA AAAGAGCAGG TAGTTAACGT
361 GACGCTTGAA GAGGTCAATG GCCACATGGA TTTCGATATA CTCGAGATAC CGACGCAACG
421 ACTTGCGCT CTCTATGCAC TTATCCCAAA CGAGCAGCAA ACCAAAATGG CCGTACCCAC
481 AGAGAAAAGCG CAGAAGATCT TCTATACGCC TGACTTTCCT GCCAGAAGAG AGGTATTTGA
541 ACATCTGAAA ACGGCGTTCT CCTGTACGAA GGATACAAGC AAAGGTTGCA GTAACGTAA
601 CAACAAAAGT TGTATTGAAA ATGAAGAGTT AATTCCTTAT TTTCTGCTGT TCCTGCTTAC
661 TGCTTTTCTC CACTCCCGG AGAGTTATGA GATCATCCTT AGCTCGGCTC AGATAACGTT
      +624
721 AAAGGAGCGC GTTTACAACA TTATATCTTC GTCACCCAGT AGACAGTGGG AGCTTACGGA
781 TGTTGCCGAT CATATATTTA TGAGTACGTC AACGCTCAA CCGAAACTTG CAGAAGAAGG
841 TACCAGCTTT AGCGACATCT ACTTATCGGC AAGAATGAAT CAGGCAGCAA AACTTTTACG
      +804
901 CATAGGCAAC CATAATGTTA ATGCTGTAGC ATTTAAAATGT GGTTATGATA GCACGTCCTA
961 CTTCAATTCAA TGTTTCAAAA AATATTTTAA AACTACGCCA TCGACATTCA TAAAAATGGC
1021 GAACCATTAA CATTTTTTGT ATCTGTCACT TAAGTAAAGA TTTTATTAA AATTGTAATA
      Δ3' UTR (+965)
1081 ATTTAAAAT CAGACTGCGC ATTAACACGC TCTATCAGGA TGGGAGGCTA TTCAATATCA
      +1044
1141 TTGTTCTGTC CGGAAGACAG CTTTACTGTA TATCTATGGT AATTTAAAGT AAGGCTGATT
1201 ATATAACACG ATTTTGTGTA ACTTGTATC GCTATGATGA CTGGTAAAAC GATATTGCCT
1261 TATTACATC GTAAGAATTC GTCCAGATGA CACTATCTCC TTCCGGCTTT AACCTGTGG
      +1235
1321 ATTAAGGCCG GCATTTTATT CATATTTATA CATCATCCGT TCCCTCTGAG AACTATTTGC
1381 CTGAACGGTT TATACCGAAA CAGTCACGCT TGTTAGCTTT CTGCCAGGCA

```

**Figura 4.27.** Secuencia del gen *hilD* de *S. Typhimurium* SL1344 (Gene ID: 11765944; locus\_tag: SL1344\_2855). En amarillo se indica la región codificante y el verde la región 3'UTR, al final de la cual se indica el terminador Rho-independiente en azul. Los oligonucleótidos usados para el reemplazamiento alélico están subrayados y los triángulos rojos indican el sitio exacto de la fusión con el gen *lacZ*. Las fusiones +76, +624, y +804 se realizaron usando el mismo oligonucleótido P2 indicado en cursiva dentro de la región codificante. Las fusiones +1044 y +1235 se realizaron con el oligonucleótido P2 indicado en cursiva dentro de la región 3'UTR. Las secuencias -10 y -35 del promotor y el nucleótido +1 también son indicadas.

Para estudiar la expresión del gen *hilD* mediante las diferentes fusiones génicas con el gen *lacZ*, cada fusión fue transducida a la cepa mutante *greAgreB*, obteniendo cepas: SV5015 *hilD::lacZ* (+76) *greAgreB*, SV5015 *hilD::lacZ* (+624) *greAgreB*, SV5015 *hilD::lacZ* (+804) *greAgreB*, SV5015 *hilD::lacZ* (+1044) *greAgreB*, SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) *greAgreB* y SV5015 *hilD*Δ3'UTR::*lacZ* (+965) *greAgreB*. Los niveles de expresión se midieron en unidades Miller mediante ensayos de determinación de la actividad β-galactosidasa en cultivos

de las cepas WT y *greAgreB* conteniendo las fusiones *lacZ*, crecidos en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. En las fusiones realizadas en la posición +76, +624 y +804, ubicadas dentro de la secuencia codificante de *hilD*, no se observan diferencias en la expresión de *hilD* entre la cepa WT y la cepa mutante *greAgreB* (figura 28 A).



**Figura 4.28.** Expresión transcripcional de *hilD* mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. **A.** Fusiones génicas realizadas en diferentes puntos de la secuencia codificante y la región 3'UTR de *hilD* fueron construidas. Las diferentes cepas utilizadas fueron: SV5015 *hilD::lacZ* (+76) (TGC-25), SV5015 *hilD::lacZ* (+76) *greAgreB* (TGC-26), SV5015 *hilD::lacZ* (+624) (TGC-29), SV5015 *hilD::lacZ* (+624) *greAgreB* (TGC-30), SV5015 *hilD::lacZ* (+804) (TGC-31), SV5015 *hilD::lacZ* (+804) *greAgreB* (TGC-32), SV5015 *hilD::lacZ* (+1044) (TGC-33), SV5015 *hilD::lacZ* (+1044) *greAgreB* (TGC-34), SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) (TGC-35), SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) *greAgreB* (TGC-36), SV5015 *hilD* $\Delta 3'UTR::lacZ$  (+965) (TGC-38) y SV5015 *hilD* $\Delta 3'UTR::lacZ$  *greAgreB* (+965) (TGC-39). Los valores de la mutante *greAgreB* son relativos a los valores de la cepa WT de cada fusión *lacZ*, respectivamente. **B.** Complementación realizada con el plásmido pBR*greAB* o pBR322 como control, en las cepas SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) (TGC-35) y SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) *greAgreB* (TGC-36). Los valores de cada cepa son absolutos. **A y B.** Las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

No obstante en la fusión en posición +1235, que contiene la totalidad del gen *hilD* a excepción del terminador transcripcional, es decir, contiene la secuencia codificante completa y la región 3'UTR, se detectó una importante reducción de

la expresión de *hilD* en la cepa mutante *greAgreB*, resultados similares a los detectados mediante qPCR y que corroboran el importante papel de los factores Gre en la expresión transcripcional de *hilD*. Estos resultados muestran claramente que el lugar en el que se ha realizado la fusión es determinante para detectar los efectos de los factores Gre. Cuando la fusión se encuentra en la posición +1044 conteniendo la totalidad de la secuencia codificante y los primeros 80 nucleótidos de la 3'UTR, la expresión de *hilD* disminuye casi a la mitad en la cepa mutante *greAgreB*, respecto a WT. Este descenso parcial podría estar indicando un efecto debido a la presencia de un fragmento de la 3'UTR, o bien a que se necesita la proteína HilD activa para la regulación por parte de los factores Gre. En la cepa en la que se ha producido una delección en la secuencia 3'UTR (fusión  $\Delta$ 3'UTR), los niveles de expresión transcripcional de *hilD* vuelven a ser similares entre las cepas WT y *greAgreB*. Como esta cepa contiene la totalidad de la secuencia codificante pero la región 3'UTR está ausente, estos resultados indican que los factores Gre regulan la expresión de *hilD* a través de la región 3'UTR y en este proceso no interviene directamente la proteína HilD. Los valores absolutos en unidades Miller de la expresión de *hilD* de las diferentes fusiones génicas de cada cepa se encuentran en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Valores absolutos de la expresión transcripcional de *hilD* obtenidos en cada fusión génica mediante ensayos de determinación de la actividad  $\beta$ - galactosidasa.

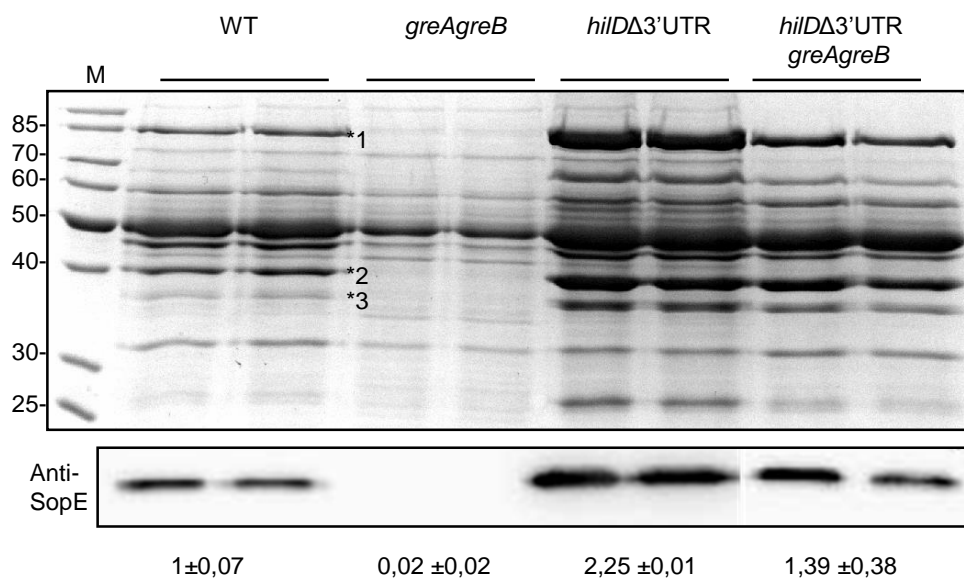
Fusión	WT	<i>greAgreB</i>
+76	149,02±3	147,69±6
+624	3457,17±170	3158,4±362
+804	1732,97±138	1658,17±108
+1044	9766,9±980	5452,77±494
+1235	988,19±70	239,44±10
$\Delta$ 3'UTR	3079,5±714	3491,3±278

La reducción de la expresión transcripcional de *hilD* observada en la cepa mutante *greAgreB* con la fusión en posición +1235 (final de la región 3'UTR), fue complementada con el plásmido pBR*greAB*, usando como control el plásmido pBR322. Este ensayo se realizó con el fin de confirmar si la ausencia de los factores Gre es la que produce esta reducción de la expresión de *hilD*. Como se

observa en la figura 4.28 B, cuando el plásmido pBR*greAB* está presente en la cepa doble mutante *greAgreB*, la expresión de *hilD* se recupera casi a niveles de WT. Esto nos confirma que efectivamente la ausencia de los factores Gre es responsable de la baja expresión de *hilD*.

Por medio del análisis del secretoma en cepas que presentaban o no la región 3'UTR, también se pudo estudiar la regulación de los factores Gre en *hilD* mediada por la 3'UTR. La obtención de las cepas mutantes para la región 3'UTR, se realizó transduciendo la mutación *hilD* $\Delta$ 3'UTR::*km* (SV6190) (López-Garrido *et al.*, 2014) a las cepas WT y mutante *greAgreB*. En la mutación *hilD* $\Delta$ 3'UTR::*km* se ha deletado un fragmento de 230 nucleótidos de la región 3'UTR del gen *hilD*, empezando desde el primer nucleótido después del codón de parada de la secuencia codificante del gen *hilD*.

Para el análisis del secretoma, se utilizaron cultivos de las cepas WT, *greAgreB*, *hilD* $\Delta$ 3'UTR y *hilD* $\Delta$ 3'UTR *greAgreB*. Como se observa en la figura 4.29, los secretomas de las cepas WT y *greAgreB* son los esperados atendiendo a resultados previos.



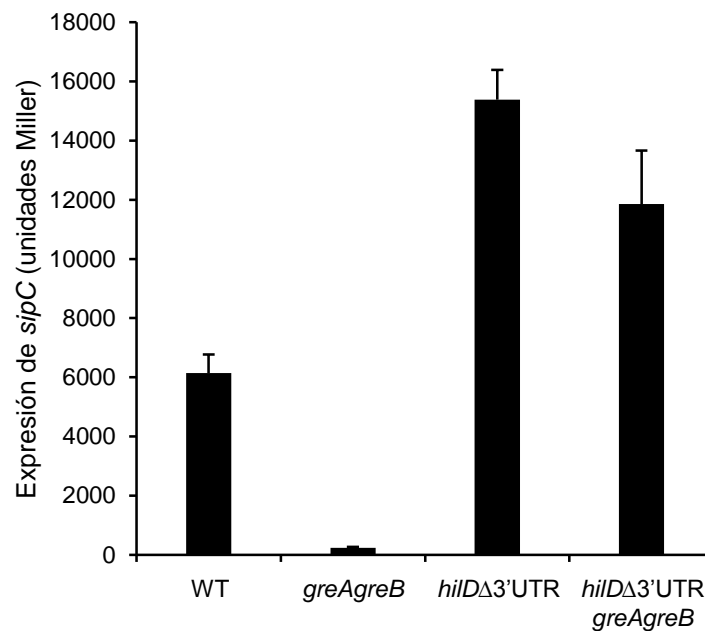
**Figura 4.29.** Los factores Gre regulan la expresión de las proteínas efectoras de la SPI-1 a través de la región 3'UTR de *hilD*. Perfil proteico (secretoma) e inmunodetección de SopE en las cepas WT (SV5015), *greAgreB* (TGC-3), *hilD* $\Delta$ 3'UTR (TGC-53) y *hilD* $\Delta$ 3'UTR *greAgreB* (TGC-37)

crecidas en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD. La detección de SopE se realizó con el anticuerpo policlonal anti-SopE. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL.

Se detectó una importante disminución de la intensidad de ciertas bandas en la cepa mutante *greAgreB*. En la cepa *hilDΔ3'UTR*, la secreción de las proteínas efectoras asignadas como 1. SipA, 2. SipC y 3. SipD, aumenta claramente respecto a la cepa WT consistente con el hecho de que la 3'UTR es un módulo negativo de regulación. En la cepa *hilDΔ3'UTR greAgreB* también se detecta una mayor expresión de estas proteínas respecto a WT y *greAgreB*, aunque los niveles son algo inferiores a los detectados en la cepa *hilDΔ3'UTR greA<sup>+</sup>greB<sup>+</sup>*. Se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína SopE. Los resultados están en concordancia con los del secretoma.

Utilizando la expresión transcripcional de *sipC* para monitorizar la cantidad de HilD activo en la célula, se revalidaron los resultados sobre la regulación de *hilD* por los factores Gre a través de la región 3'UTR. El gen *sipC* codifica para la proteína efectora SipC, que también forma parte del aparato de translocación del T3SS codificado en la SPI-1 y su expresión es dependiente de HilD. Los ensayos transcripcionales mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se realizaron en las cepas WT, *greAgreB*, *hilDΔ3'UTR* y *hilDΔ3'UTR greAgreB* conteniendo una fusión entre *sipC* y el gen *lacZ*, transducida a partir de la cepa SV5293 (14028 *sipC::lacZ*) (López-Garrido & Casadesús, 2010). Los cultivos fueron crecidos en las mismas condiciones que en el secretoma de la figura 4.29. Como era de esperar, los niveles de expresión de *sipC* disminuyen significativamente (en aproximadamente 25 veces) en la cepa mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT cuando está presente la región 3'UTR (figura 4.30). Sin embargo, en ausencia de la región 3'UTR, los niveles de *sipC* aumentan tanto en la cepa WT como en la cepa *greAgreB*, siendo los niveles de esta última un

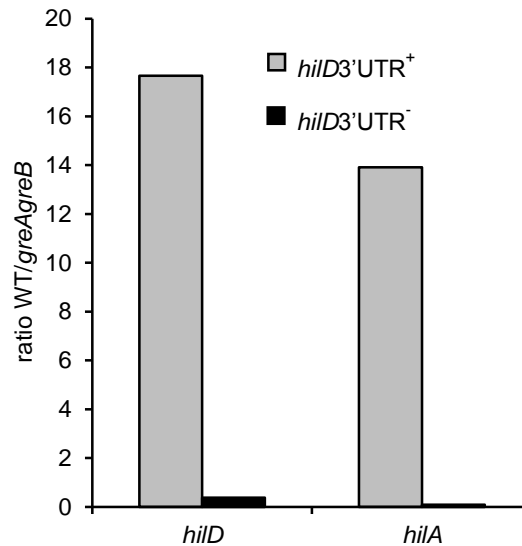
similares a los de WT; resultados que se correlacionan con los obtenidos en el secretoma de la figura 4.29. Por lo tanto se puede concluir que en ausencia de la región 3'UTR los factores Gre no son esenciales para la expresión y secreción de las proteínas efectoras, dicho de otra manera, en presencia de la región 3'UTR se requiere la presencia de los factores Gre para la apropiada expresión de *hilD*.



**Figura 4.30.** Expresión transcripcional de *sipC* mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Cultivos independientes de las cepas WT (TGC-40), *greAgreB* (TGC-41) *hilD*Δ3'UTR (TGC-54) y *hilD*Δ3'UTR *greAgreB* (TGC-55) con la fusión transcripcional *sipC*::*lacZ*, fueron crecidos en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

La expresión transcripcional de *hilD* y *hilA* en presencia y en ausencia de la *hilD*3'UTR fue estudiada mediante qPCR. Para ello, se aisló ARN total a partir de cultivos crecidos en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 de las cepas WT, *greAgreB*, *hilD*Δ3'UTR y *hilD*Δ3'UTR *greAgreB*. Los resultados se muestran como la cantidad de ARNm (*hilA* o *hilD*) en WT respecto a su correspondiente mutante *greAgreB* (figura 4.31). Se puede observar que en presencia de la 3'UTR hay una diferencia muy importante en la expresión de ambos genes entre WT y *greAgreB*, siendo la expresión en WT comparada con la cepa *greAgreB*

entre 18 (*hilD*) y 14 (*hilA*) veces superior. En ausencia de la región 3'UTR esta diferencia no se observa, siendo los niveles de expresión incluso más elevados en la cepa *greAgreB* que en WT.

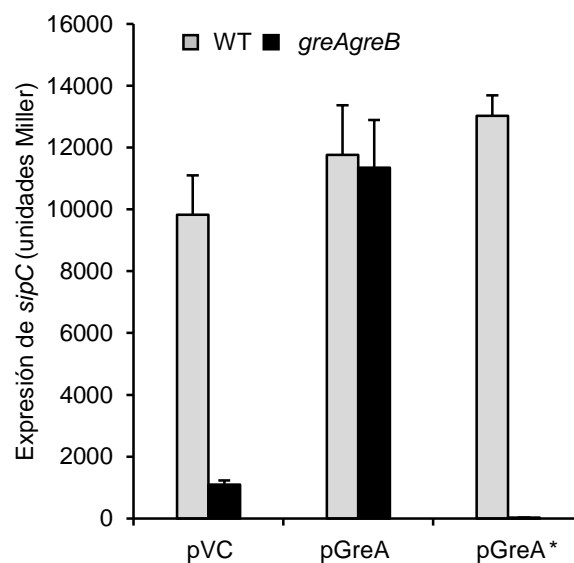


**Figura 4.31.** Expresión transcripcional de los genes *hilD* y *hilA* evaluada mediante qPCR, en las cepas WT (SV5015), *greAgreB* (TGC-3), *hilDΔ3'UTR* (TGC-53) y *hilDΔ3'UTR greAgreB* (TGC-37) cultivadas en LB a 37 °C en agitación tras ser inoculadas a una DO<sub>600nm</sub> de 0,001 hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. Los ensayos se realizaron con la pareja de oligonucleótidos *hilD*RTFW/*hilD*qPCRRV y *hilA*qPCR1/*hilA*qPCR2, respectivamente. Los resultados, presentados como el ratio entre WT y *greAgreB*, fueron normalizados utilizando la detección del gen *gapA* (GAPDH) con la pareja de oligonucleótidos GAPDHqPCR1/GAPDHqPCR2, como control interno.

#### 4.2.8 La actividad antipausa de la transcripción de los factores Gre es necesaria para la correcta expresión de *hilD*

Para estudiar si la actividad antipausa de la transcripción de los factores Gre es necesaria para la regulación de *hilD* se utilizó un alelo *greA* (D41A, E44Y) de *E. coli*. En *E. coli* se ha descrito que el alelo *greA* (D41A, E44Y) codifica para una proteína denominada GreA\*, que ha perdido la actividad antipausa de la transcripción. Los residuos D41 y E44 son responsables de la actividad antipausa de GreA al interaccionar directamente con el ion Mg<sup>+2</sup> del centro catalítico de la ARNpol (Vinella *et al.*, 2012) (Opalka *et al.*, 2003) (Laptenko *et al.*, 2003). En anteriores apartados se demostró que las proteínas GreA de *E.*

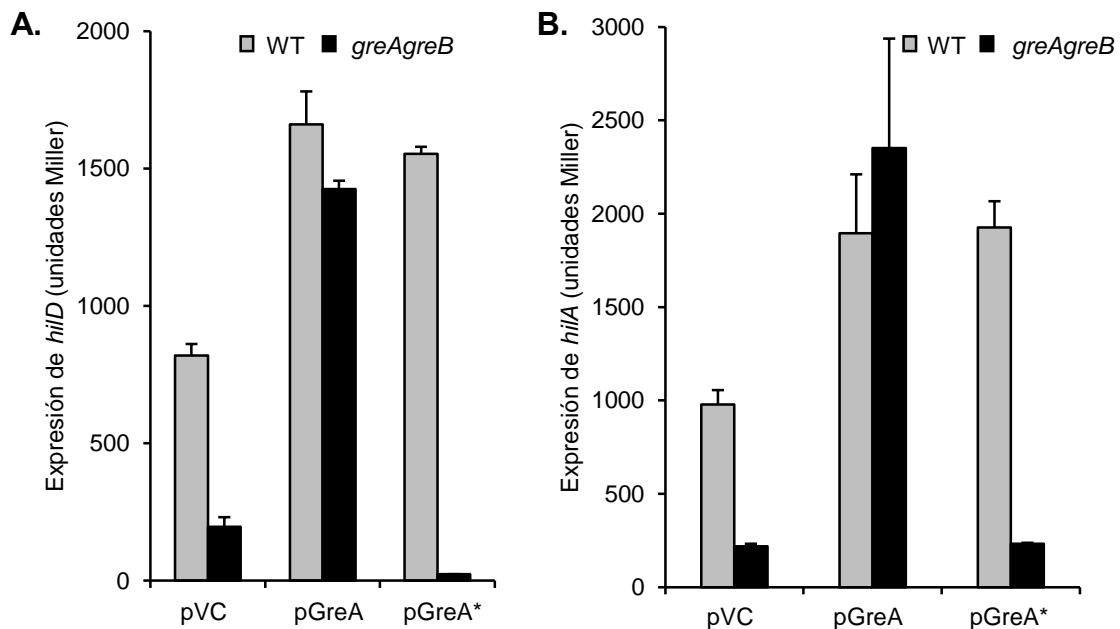
*coli* y *Salmonella* presentan una alta identidad (96,83 %) y similitud (99,36 %) entre ellas (figura 4.5 A, apartado 4.1.2). Se llevaron a cabo análisis de la expresión de *sipC* en la cepa *greAgreB* y la correspondiente WT, en presencia de los plásmidos pVC (vector control, pHM1883), pGreA (pHM1883+GreA, pHM1873) y pGreA\* (pHM1883+GreA [D41A, E44Y], pHM1854). La expresión transcripcional de *sipC* fue monitorizada mediante ensayos de determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. En la figura 4.32 se observa que, en presencia del vector control, la mutación *greAgreB* causa una reducción de la actividad transcripcional de *sipC* de 10 veces con respecto a la cepa WT. En presencia del plásmido pGreA, se observa la complementación de la mutación *greAgreB* alcanzando los niveles de la cepa WT. Sin embargo, cuando está presente el plásmido con el alelo GreA\*, no se observa complementación en la cepa mutante *greAgreB*.



**Figura 4.32.** Expresión transcripcional de *sipC* mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Cultivos independientes de las cepas WT (TGC-34) y doble mutante *greAgreB* (TGC-35) con la fusión transcripcional *sipC::lacZ* y los plásmidos pVC (vector control, pHM1883), pGreA (pHM1883+GreA, pHM1873) y pGreA\* (pHM1883+GreA [D41A, E44Y], pHM1854), fueron crecidos en LB con 25  $\mu$ g/ml de espectinomicina a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.



Estudios similares se llevaron a cabo para analizar la expresión transcripcional de los genes *hilD* y *hilA*. Para los ensayos de *hilD* se utilizaron las cepas WT y *greAgreB* con la fusión *lacZ* ubicada en la región +1235 que incluye la secuencia codificante de *hilD* y la región 3'UTR (cepas TGC-35 y TGC-36). En el caso de los ensayos para ver la expresión de *hilA*, se usaron las cepas WT y *greAgreB* con la fusión *hilA::lacZ* (SV5015UB2 y TGC-7). Los resultados de la expresión transcripcional de *hilD* y *hilA* (figura 4.33 A y B) concuerdan con los resultados de la expresión de *sipC*, la cepa *greAgreB* con el plásmido pGreA, recupera los niveles de expresión de los genes *hilD* y *hilA* respecto a la cepa WT, lo que no ocurre en presencia del plásmido pGreA\*.



**Figura 4.33.** Expresión transcripcional de *hilD* (A) y *hilA* (B) mediante determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Las siguientes cepas conteniendo los plásmidos de *E. coli* pHM1883 (vector control, pVC), pHM1873 (pHM1883+GreA, pGreA) y pHM1854 (pHM1883+GreA [D41A, E44Y], pGreA\*) fueron utilizadas: SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) (TGC-35), SV5015 *hilD::lacZ* (+1235) *greAgreB* (TGC-36), *hilA::lacZ* (SV5015UB2) y *hilA::lacZ greAgreB* (TGC-7). Cultivos independientes fueron crecidos en LB con 25  $\mu$ g/ml de espectinomicina a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

Estos resultados indican que la proteína GreA con actividad antipausa intacta es necesaria para la apropiada expresión de *hilD*, *hilA* y *sipC*. Además, el hecho de que la proteína GreA de *E. coli* es capaz de complementar la mutación del gen

*greA* de *Salmonella* claramente evidencia que no solamente hay una elevada conservación de secuencia de ambas proteínas sino también de funcionalidad y estructura. Estos resultados sugieren que los factores Gre, conocidos como factores de la elongación de la transcripción, estarían actuando en la elongación de la transcripción del gen *hilD* y que además, el lugar donde ejercen su función antipausa no se encuentra dentro de la región codificante de *hilD*, si no en la región 3'UTR.

### **4.3 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en *Salmonella***

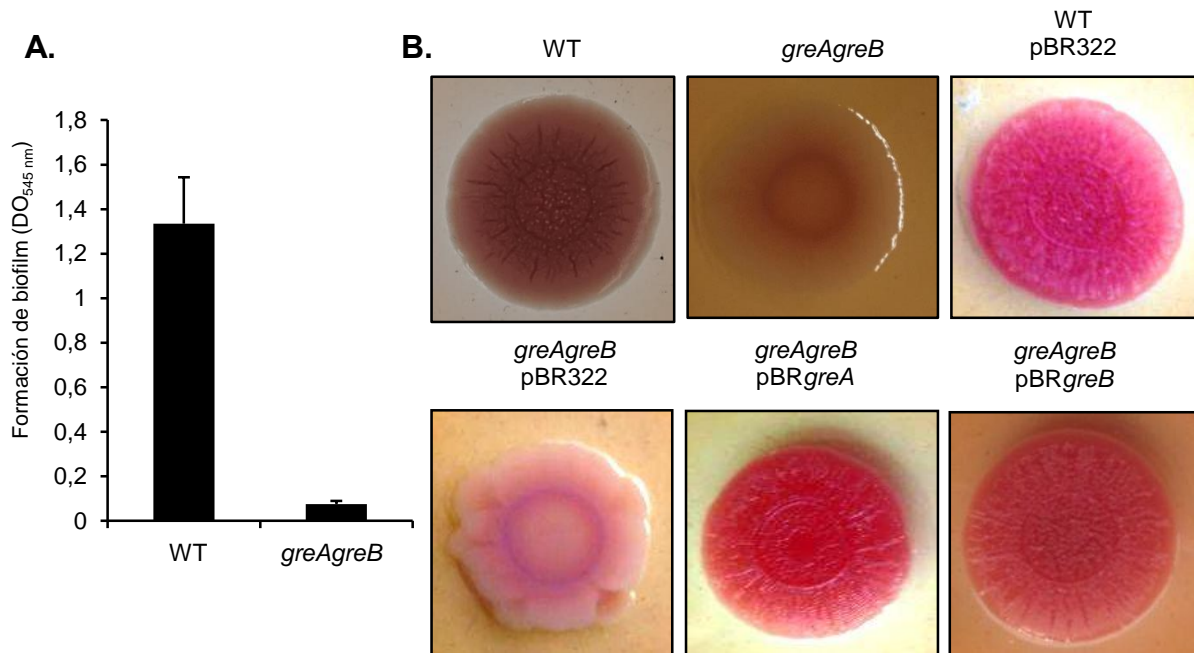
Además de la invasión y la motilidad, otro de los procesos celulares estudiados en este trabajo fue la formación de biofilm en *S. Typhimurium* y el posible efecto de los factores Gre sobre su regulación. Como se comentó en la introducción, el biofilm se define como una estructura entrelazada de material extracelular en cuyo interior se alojan las células bacterianas. Su formación conlleva importantes cambios en la fisiología celular (Costerton *et al.*, 1987). En *Salmonella*, los cambios fisiológicos están coordinados por una sofisticada red de señalización centrada en la expresión de *csgD*, regulador principal de la formación de biofilm. El crecimiento en forma de biofilm confiere a la población bacteriana la capacidad de hacer frente a diversas condiciones adversas del ambiente como presencia de desinfectantes, antibióticos o componentes del sistema inmune del organismo hospedador. La transmisión y persistencia de *Salmonella* entre hospedadores, y su supervivencia en el ambiente, se ven favorecidos por su habilidad para formar biofilm en diversas superficies tanto bióticas (plantas, cálculos biliares y células epiteliales) como abióticas (acero inoxidable, vidrio y plástico) (Revisión de Simm *et al.*, 2014). Estudios previos han descrito que las condiciones óptimas para la formación de biofilm *in vitro* para *S. Typhimurium* son crecimiento en estático en un medio rico, como el LB, en ausencia de NaCl a 28 °C (Römling *et al.*, 1998) (Zogaj *et al.*, 2001) (De Oliveira *et al.*, 2014).

#### **4.3.1 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en *Salmonella* SV5015**

Para analizar el posible efecto de los factores Gre en la capacidad de *Salmonella* para formar biofilm, en este trabajo se utilizó como superficie poliestireno (Aberg *et al.*, 2006). Se crecieron cultivos de las cepas WT (SV5015) y mutante *greAgreB* (TGC-3) en LB hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,5-0,7. Los cultivos fueron diluidos en LB 0 g/l de NaCl en una proporción de 1:3 en placas de poliestireno de 96 pocillos. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 horas sin agitación. Después de lavados sucesivos con PBS y fijación con metanol, el

biofilm fue teñido con cristal violeta. Para cuantificar la cantidad de biomasa presente en los biofilm, el cristal violeta fue solubilizado con ácido acético glacial y se determinó la  $DO_{545nm}$  del eluido. Los resultados indican una importante reducción, de aproximadamente 20 veces, en la biomasa en forma de biofilm en la cepa mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT (figura 4.34 A).

Otra manera de estudiar la formación de biofilm en *Salmonella* es mediante el análisis del morfotipo rdar (*red, dry and rough*). El morfotipo rdar se caracteriza por la formación de colonias extendidas con superficie seca sobre placas de Congo red (agar LB 0 g/l de NaCl, conteniendo los colorantes Congo red y azul de Coomassie). Este morfotipo proporciona información sobre la producción de curli y/o celulosa, componentes principales de la matriz extracelular que forma el biofilm de *Salmonella*. La característica rugosa de las colonias es indicadora de la producción de celulosa, y el color rojo de la producción de curli (Austin *et al.*, 1998) (Römling *et al.*, 1998). Se analizó el morfotipo rdar de las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) tras incubar a 28 °C por 7 días en placas Congo red. Los resultados indican claramente la formación del morfotipo rdar en la cepa WT, que se caracteriza por presentar colonias rojas, secas y rugosas (figura 4.34 B). La ausencia del morfotipo rdar fue evidente en la cepa doble mutante *greAgreB*, pues se observaron colonias blancas y lisas típicas del morfotipo saw, liso y blanco (*smooth and white*), indicando la no producción de celulosa y curli en cepas mutantes para los factores Gre (Jain & Chen, 2007). Estudios de complementación en la mutación *greAgreB* fueron llevados a cabo usando los plásmidos pBR*greA*, pBR*greB* y pBR322 como control. Se observó la restitución del morfotipo rdar en la cepa *greAgreB* tanto con el plásmido pBR*greA* como pBR*greB* indicando que los factores Gre son esenciales para la correcta expresión de factores implicados en la formación de biofilm en *S. Typhimurium*, en las condiciones experimentales establecidas. Estos resultados indican que es suficiente un único factor Gre, al menos en condiciones de multicopia génica, para que puedan expresarse apropiadamente los genes que desencadenan el morfotipo rdar.



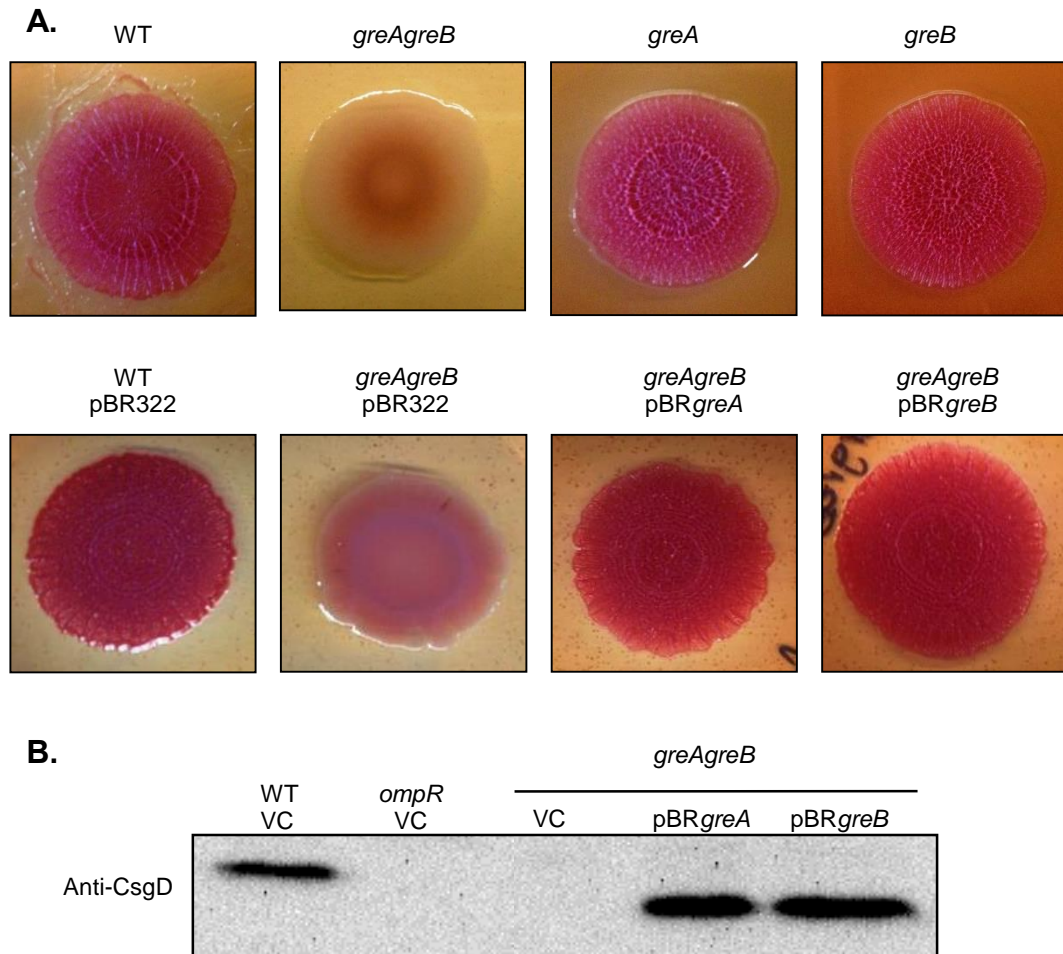
**Figura 4.34.** Los factores Gre juegan un papel importante en la formación de biofilm en *S. Typhimurium* SV5015. **A.** Formación de biofilm de la cepa WT (SV5015) y la doble mutante *greAgreB* (TGC-3). Cultivos líquidos bacterianos de ambas cepas fueron crecidos en LB a 37 °C en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,5-0,7. Los cultivos fueron diluidos en LB 0 g/l en una proporción de 1:3 en placas de poliestireno de 96 pocillos. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 horas sin agitación. Se realizaron lavados sucesivos con PBS y fijación con metanol. El biofilm fue teñido con 0,1 % de cristal violeta por 15 min. Para la cuantificación, el colorante retenido fue solubilizado con ácido acético glacial al 33 % (v/v). La cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro de placas ASYS UVM 340 a DO<sub>545nm</sub>. Las barras representan la media y desviación estándar de 8 réplicas técnicas. **B.** Análisis de la formación de biofilm mediante el estudio del morfotipo rdar de la cepa WT (SV5015) y la doble mutante *greAgreB* (TGC-3). Las cepas fueron inoculadas en placas Congo red e incubadas a 28 °C durante 7 días. La complementación de la mutación *greAgreB* fue realizada con los plásmidos pBR*greA*, pBR*greB* y pBR322 como control, en placas de Congo red con ampicilina 50 µg/ml.

#### 4.3.2 Papel de los factores Gre en la regulación de la formación de biofilm en *Salmonella* UMR1

Para profundizar en el mecanismo mediante el cual los factores Gre pueden ejercer un papel sobre la formación de biofilm en *Salmonella*, se realizó una estancia en el grupo de investigación de la Dra. Ute Römling del Instituto Karolinska de Estocolmo, experta en el estudio del biofilm en *Salmonella*. Fruto

de esta colaboración, se llevaron a cabo ensayos con la cepa WT UMR1 (*S. Typhimurium* ATCC 14028-1s NarI<sup>r</sup>), cepa modelo en el grupo de investigación (Römling *et al.*, 1998). Se realizaron ensayos de formación de biofilm mediante el análisis por morfotipo rdar en las cepas WT (UMR1) y sus derivadas *greA* (TGC-43), *greB* (TGC-44) y *greAgreB* (TGC-45) sembradas en placas de Congo red e incubadas a 28 °C durante 7 días. Los resultados fueron similares a los previamente obtenidos en la cepa SV5015 y su derivada *greAgreB*. La cepa WT presenta el morfotipo rdar y la doble mutante *greAgreB* carece completamente del mismo, mostrando el morfotipo saw (figura 4.35 A). Además, las mutantes simples parecen no afectar la formación del fenotipo rdar, pues ambas presentan las características de la cepa salvaje. Se realizaron ensayos de complementación de la mutación *greAgreB* con los plásmidos pBR*greA*, pBR*greB* y pBR322 como control y se obtuvo la completa recuperación del morfotipo rdar con ambos plásmidos.

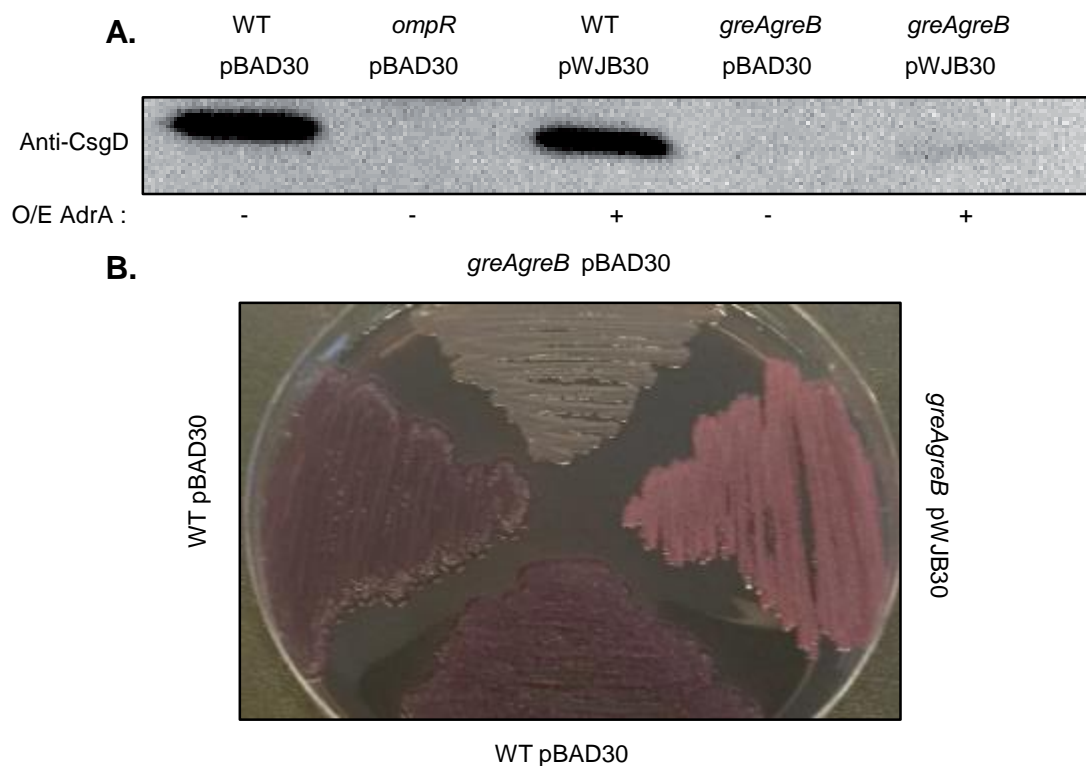
Una vez corroborado que el efecto de los factores Gre no es específico de la cepa SL1344, se decidió profundizar en el estudio de cómo estos factores de elongación de la transcripción podrían afectar la producción de biofilm. Como se ha mencionado previamente, CsgD es el regulador principal que controla la expresión de factores promotores de biofilm. Se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección de la proteína CsgD en la cepa WT (UMR1) y sus mutantes derivadas *greAgreB* y *ompR*. La mutante *ompR* se utilizó como control negativo, ya que se ha descrito que el gen *ompR* es necesario para activar la transcripción del gen *csgD* (Römling *et al.*, 1998). Los ensayos se realizaron a partir de cultivos crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C durante 24 horas. Como era de esperar, en la cepa mutante *ompR* no se detectó expresión de CsgD. No se detectó tampoco presencia de CsgD en la cepa doble mutante *greAgreB*, fenotipo que fue restaurado hasta los niveles de WT cuando se realizó la complementación con los plásmidos pBR*greA* y pBR*greB* (figura 4.35 B). Estos resultados sugieren que los factores Gre estarían jugando un papel importante en la formación de biofilm a través de la regulación de la expresión de CsgD.



**Figura 4.35.** Los factores Gre juegan un papel importante en la formación de biofilm en *S. Typhimurium* UMR1. **A.** Análisis de la formación de biofilm mediante el estudio del morfotipo rdar de la cepa WT (UMR1) y sus derivadas las cepas *greA* (TGC-43), *greB* (TGC-44), y la doble mutante *greAgreB* (TGC-45). Ensayos de complementación se realizaron en la cepa *greAgreB* conteniendo el plásmido pBR322 o pBR*greA* o pBR*greB*. Las cepas fueron inoculadas en placas Congo red con ampicilina 50 µg/ml e incubadas a 28 °C durante 7 días. **B.** Inmunodetección de la proteína CsgD a partir de cultivos independientes de las cepas WT (UMR1) conteniendo el plásmido pBR322 (VC), la cepa *ompR* (MAE46) con el plásmido pBR322 y la cepa *greAgreB* (TGC-45) conteniendo el plásmido pBR322 o pBR*greA* o pBR*greB*. Los cultivos fueron crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C durante 24 horas. La detección de CsgD se realizó con un anticuerpo policlonal anti-CsgD. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial LUMI-LIGHT.

CsgD se encuentran codificado en el operón que codifica para la síntesis del curli, que consiste en dos operones transcritos de manera divergente, *csgBAC* y *csgDEFG*. *In vitro*, la proteína CsgD no fosforilada se une directamente a la región promotora del gen *csgB* y activa transcripcionalmente la síntesis de curli.

CsgD también regula la síntesis de celulosa controlando positivamente la expresión de la diguanilato ciclasa AdrA uniéndose directamente a la región promotora del gen *adrA* (Zakikhany *et al.*, 2010) (Römling *et al.*, 2000). De esta manera AdrA puede regular la síntesis de celulosa a través de la síntesis de c-di-GMP, el cual activa de manera alostérica a BcsA, una celulosa sintetasa (Zogaj *et al.*, 2001) (Simm *et al.*, 2004). Se estudió el efecto de la expresión ectópica de AdrA utilizando el plásmido pWJB30 en el que se clonó el gen *adrA* en el vector de expresión pBAD30 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (Guzman *et al.*, 1995) (Zogaj *et al.*, 2001). Se estudiaron los niveles de CsgD, así como el morfotipo *rdar* en las diferentes cepas. En relación con los niveles de CsgD, se observa que la sobreexpresión de AdrA no presenta una recuperación de los niveles de CsgD en la cepa *greAgreB* (figura 4.36 A).



**Figura 4.36.** Los factores Gre regulan la formación de biofilm a través de CsgD. **A.** Inmunodetección de la proteína CsgD a partir de cultivos crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl con ampicilina 50 µg/ml y L-arabinosa al 0,2 % a 28 °C durante 24 horas. Las cepas analizadas fueron WT (UMR1) conteniendo el plásmido pBAD30 o pWJB30, la cepa *ompR* (MAE46) con el plásmido pBAD30 y la cepa *greAgreB* (TGC-45) conteniendo el plásmido pBAD30 o pWJB30. CsgD fue detectada con un anticuerpo policlonal anti-CsgD. La detección de las bandas se llevó



a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial LUMI-LIGHT. **B.** Morfotipo rdar de las cepas indicadas crecidas en las mismas condiciones que **A** en placas Congo red.

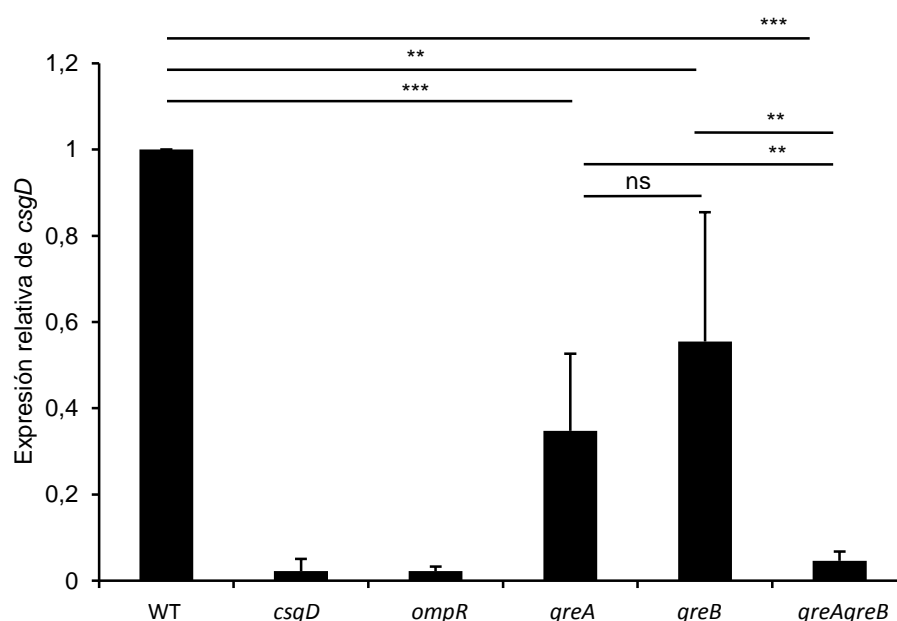
Por su parte, en relación a la formación de biofilm, la cepa WT con el plásmido control o con la sobreexpresión de *AdrA* presenta un claro morfotipo rdar (figura 4.36 B) mientras que la cepa doble mutante *greAgreB* con el plásmido control no presenta el morfotipo rdar. Interesantemente, la expresión de *AdrA* en la cepa doble mutante *greAgreB* presentó un morfotipo pdar: rosa, seco y rugoso (*pink, dry and rough*), indicador de la producción de celulosa pero no de curli (Jain & Chen, 2007). Estos resultados indican que el efecto de los factores Gre en la producción de celulosa se encuentra localizado aguas arriba de *AdrA*, ya que los genes asociados aguas abajo de *AdrA* no requieren de los factores Gre. Atendiendo a que *CsgD* es el principal activador de la expresión de *AdrA* y a los datos obtenidos en la inmunodetección de *CsgD*, se puede concluir que los factores Gre son necesarios para la correcta la expresión de *CsgD*.

### **4.3.2.1 Papel de los factores Gre en la expresión transcripcional del gen *csgD***

La regulación de la expresión de *CsgD* es un proceso finamente regulado a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional, en respuesta a múltiples señales ambientales que incluyen, entre otros, el nivel de nutrientes temperatura, tensión de oxígeno y osmolaridad.

El papel de los factores Gre en la expresión de *CsgD* fue estudiado mediante ensayos transcripcionales por qPCR del gen *csgD*. Para ello se usaron las cepas WT (UMR1) y sus derivadas *greA* (TGC-43), *greB* (TGC-44) y *greAgreB* (TGC-45). Se usaron como controles negativos las cepas mutantes *csgD* (MAE50) y *ompR* (MAE46). Las cepas fueron crecidas en las mismas condiciones que para la inmunodetección de *CsgD*. Los niveles de expresión de *csgD* relativos a la cepa WT, fueron bajos en las cepas controles mutantes *csgD* y *ompR* (figura 4.37). En ausencia de ambos factores Gre la expresión de *csgD* disminuye drásticamente, en aproximadamente 25 veces, siendo básicamente indetectable

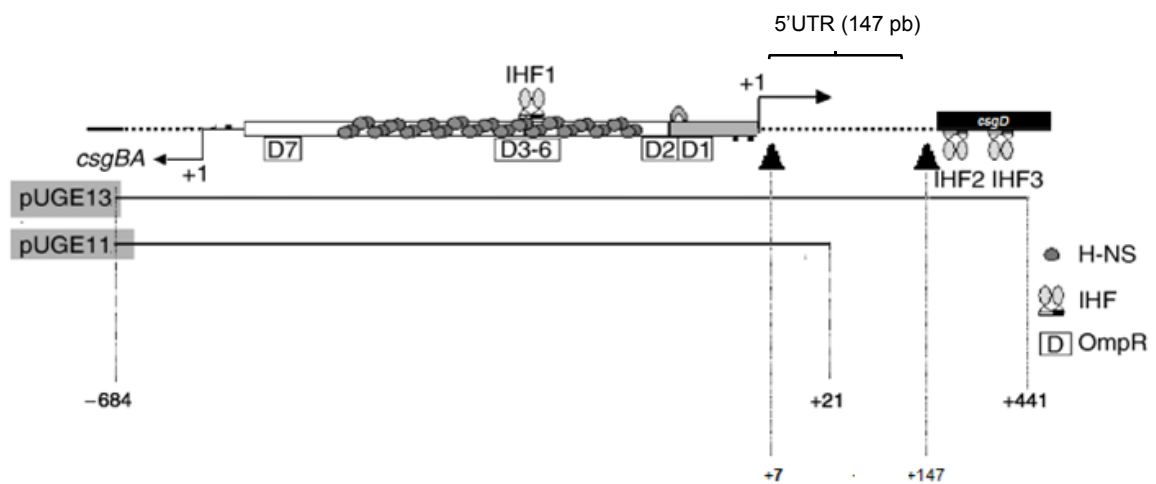
(nivel de expresión similar al detectado para la cepa control  $\Delta csgD$ ). Sin embargo, las mutantes simples *greA* y *greB* presentaron una disminución de aproximadamente 3 y 2 veces en la expresión de *csgD* relativa a WT, respectivamente. Estos resultados se correlacionan con el fenotipo descrito previamente, donde las mutantes simples ejercen un menor efecto que la cepa doble mutante para los factores Gre. Estos datos permiten confirmar que los factores Gre son necesarios para la correcta expresión transcripcional del gen *csgD* y la subsecuente formación de biofilm en *Salmonella* en las condiciones experimentales establecidas.



**Figura 4.37.** Expresión transcripcional del gen *csgD* evaluada mediante qPCR, en las cepas WT (UMR1), *greA* (TGC-43), *greB* (TGC-44) y *greAgreB* (TGC-45). Se usaron como controles negativos las cepas mutantes *csgD* (MAE50) y *ompR* (MAE46). Los ensayos se realizaron a partir de cultivos crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C durante 24 horas. Se usó la pareja de oligonucleótidos qCsgDffw/qCsgDrev. Los resultados fueron normalizados utilizando la detección del gen *recA* con la pareja de oligonucleótidos qrecAFFW/qrecAREV, como control interno. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 réplicas biológicas independientes realizadas con 4 réplicas técnicas cada una. Significancia estadística: \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

La regulación transcripcional de *csgD* es compleja. Existen proteínas que se unen directamente en el promotor del gen *csgD* como OmpR, IHF y H-NS que pueden competir entre sí en respuesta a diferentes condiciones ambientales,

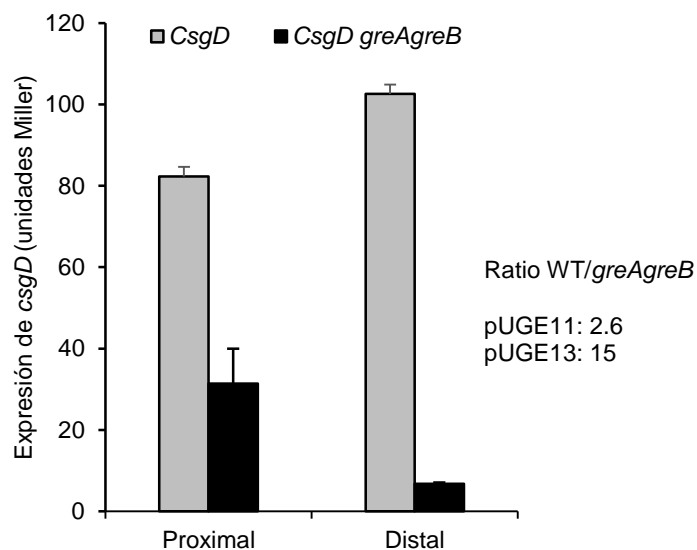
induciendo y/o reprimiendo la expresión de *csgD* (Revisión de Simm *et al.*, 2014) (figura 4.38). En el caso de la proteína IHF por ejemplo, estudios previos han descrito 3 sitios de unión: IHF1, IHF2 e IHF3, cada uno con una función diferente en la regulación de la expresión de *csgD*. El sitio de unión IHF1, ubicado aguas arriba del promotor de *csgD*, potencia la transcripción del gen *csgD*. IHF2, ubicado en la ORF de *csgD*, no afecta su expresión. Por su parte el sitio de unión IHF3 en la posición +353/+393 de la región codificante del gen *csgD*, reprime la expresión de *csgD* (Gerstel *et al.*, 2006). OmpR e IHF1 compiten por el sitio de unión dependiendo del estado de fosforilación de OmpR, que en respuesta a diferentes estímulos ambientales, se une al promotor de *csgD* potenciando su expresión. H-NS se une a las regiones ricas en A-T de la secuencia intergénica entre los operones *csgBAC* y *csgDEFG* y tiene un efecto indirecto sobre la expresión a nivel transcripcional de *csgD* (Gerstel *et al.*, 2003).



**Figura 4.38.** Organización del promotor del gen *csgD* en *S. Typhimurium*, localización del inicio de transcripción y los sitios de unión de las proteínas H-NS, IHF y OmpR. Se indican las fusiones transcripcionales clonadas en el plásmido pQF50 y denominadas pUGE11 y 13. Los triángulos negros corresponden a las fusiones cromosómicas +7 y +147. También se indica la región 5'UTR de 147 nucleótidos del gen *csgD*. Modificado de (Gerstel *et al.*, 2006).

Una vez definido que los factores Gre regulan *csgD* a nivel transcripcional, se quiso determinar en qué nivel de la transcripción de *csgD* actúan los factores Gre. Se llevaron a cabo análisis transcripcionales del gen *csgD* utilizando diferentes fusiones génicas. Inicialmente se utilizaron dos fusiones plasmídicas, el plásmido pUGE11 -684/+21 (fusión proximal) y el plásmido pUGE13 -

684/+441 (fusión distal) utilizadas previamente para estudiar la regulación transcripcional de *csgD*. Ambas regiones contienen el promotor del gen *csgD* y el plásmido pUGE13 contiene también la totalidad de la región 5'UTR (147 nucleótidos) y parte de la región codificante del gen *csgD* (figura 4.38) (Farinha & Kropinski, 1990) (Gerstel *et al.*, 2006). Para los ensayos transcripcionales, se usaron las cepas mutantes *csgD* (MAE50) y su derivada *csgD greAgreB* (TGC-60) en presencia de los plásmidos pUGE11 y pUGE13. Se utilizaron cepas mutantes *csgD* para facilitar la manipulación de las muestras al evitarse la formación del morfotipo rdar que impediría la correcta resuspensión de las células bacterianas. Los cultivos de las cepas bacterianas fueron crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C durante 24 horas y posteriormente resuspendidos en 1 ml de LB 0 g/l de NaCl ajustados a una  $DO_{600nm}$  de 1,0. La deficiencia de los factores Gre causa una disminución en la expresión de *csgD* en ambas fusiones génicas, si bien la magnitud del efecto es diferente dependiendo de si la fusión es proximal o distal. Así en la fusión distal (-684/+441), se observa una importante disminución de la expresión de hasta 15 veces, mientras que en la fusión proximal esta disminución es únicamente de 2,5 veces (figura 4.39).

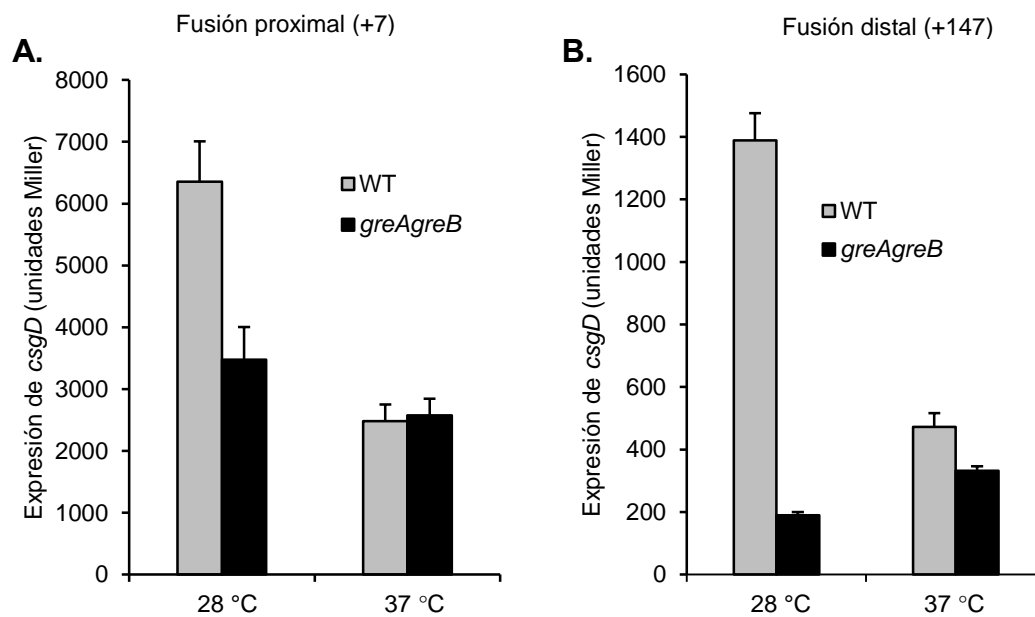


**Figura 4.39.** Expresión transcripcional del gen *csgD* mediante ensayos de determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en cultivos de las cepas UMR *csgD* (MAE50) y UMR *csgD greAgreB* (TGC-60) en presencia de los plásmidos pUGE11 y pUGE13, respectivamente. Los cultivos fueron crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl en presencia de ampicilina 50  $\mu$ g/ml, a 28 °C

durante 24 horas, posteriormente resuspendidos en 1 ml de LB 0 g/l de NaCl y ajustados a una  $DO_{600nm}$  de 1,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

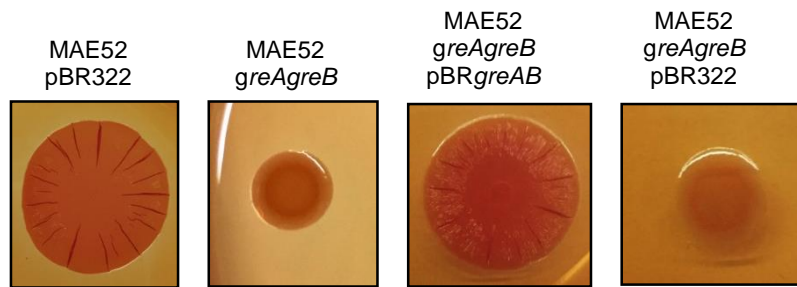
Para descartar que el efecto de los factores Gre observado en las fusiones proximal y distal de los plásmidos pUGE11 y 13 sea debido a un efecto en el número de copias de los plásmidos, se construyeron dos fusiones cromosómicas entre el gen *csgD* y el gen *lacZ*. Las fusiones construidas se realizaron en las posiciones +7 y +147, respecto a la posición +1 del inicio de la transcripción del gen *csgD* (figura 4.38). Los ensayos se realizaron mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas derivadas de WT (UMR1) y su mutante *greAgreB*, conteniendo las fusiones +7 o +147. Los cultivos fueron crecidos en placas de LB 0 g/l de NaCl a 28 °C durante 24 horas. Como se observa en la figura 4.40 B en la fusión distal, la mutación *greAgreB* causa un drástico efecto en la expresión de *csgD* con una disminución de más de 7 veces respecto a WT. Sin embargo, con la fusión proximal el efecto observado es muy reducido, siendo la reducción inferior a 2 veces (figura 4.40 A). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en las fusiones de los plásmidos pUGE11 y 13 y sugirieron que la región localizada entre +7 y +147 de *csgD* podría ser necesaria para la regulación de *csgD* mediada por los factores Gre, lo que nos llevaría a proponer que pueda existir en esta región una secuencia de pausa de la transcripción. Resulta interesante que los factores Gre ejerzan su efecto en la región 5' UTR del gen *csgD* ya que previas publicaciones describen que esta secuencia es necesaria para la regulación positiva de la transcripción de *csgD* en fase estacionaria de crecimiento, pues en ausencia de esta región, los niveles de expresión de *csgD* disminuyen drásticamente (Gerstel *et al.*, 2006).

Se realizaron experimentos de expresión de *csgD* a 37 °C. En la figura 4.40 A y B se observa que a 37 °C no se detecta ningún efecto de los factores Gre en ninguna de las dos fusiones. La no detección de un efecto de los factores Gre en la expresión transcripcional de *csgD* a 37 °C, podría deberse a que los niveles de expresión son tan bajos que no permiten la detección de una reducción aún mayor, o bien a que los factores Gre solo ejercen un efecto estimulador a bajas temperaturas.



**Figura 4.40.** Expresión transcripcional del gen *csgD* mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas **A.** UMR *csgD::lacZ* (+7) (TGC-46), *csgD::lacZ* (+7) *greAgreB* (TGC-47), *csgD::lacZ* (+147), **B.** (TGC-48) y *csgD::lacZ* (+147) *greAgreB* (TGC-49). **A y B.** Cultivos crecidos en placas de LB agar 0 g/l a 28 °C o 37 °C durante 24 horas, fueron resuspendidos en 1 ml de LB 0 g/l de NaCl y ajustados a una  $DO_{600nm}$  de 1,0. Las barras representan la media y desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes realizadas con 2 réplicas técnicas cada una.

Para diferenciar entre ambas posibilidades, se utilizó una cepa que contiene una mutación puntual en el promotor del gen *csgD*, denominada MAE52 (UMR1 *PcsgD1*) que incrementa hasta 3 veces la expresión de *csgD* independientemente de la temperatura. Así la formación del morfotipo rdar se puede observar a 37 °C tras una incubación de 24 horas (Römling *et al.*, 1998) (Gerstel *et al.*, 2006). Los estudios de formación de biofilm mediante el análisis del morfotipo rdar se realizaron en las cepas MAE52 y su derivada *greAgreB* a 37 °C durante 24 horas en placas Congo red. En la figura 4.41 se observa que, a diferencia de la cepa MAE52, la doble mutante *greAgreB* no presenta el morfotipo rdar.



**Figura 4.41.** El efecto de los factores Gre sobre la formación de biofilm es independiente de la temperatura. Análisis de la formación de biofilm mediante el estudio del morfotipo rdar de la cepa MAE52 y su derivada la doble mutante *greAgreB* (TGC-50) fueron realizados. Las cepas fueron inoculadas en placas Congo red con ampicilina 50 µg/ml e incubadas a 37 °C durante 24 horas. La complementación de la mutación *greAgreB* fue realizada con el plásmido pBR*greAB* y pBR322 como control.

Estudios de complementación en la mutante *greAgreB* con el plásmido pBR*greAB* mostraron la recuperación del morfotipo rdar, revelando que los factores Gre son importantes para la correcta producción de biofilm tanto a 28 °C como a 37 °C, indicando que el efecto de los factores Gre sobre la formación de biofilm es independiente de la temperatura.

#### 4.4 Efecto de los factores Gre en la expresión génica de *Salmonella*. Análisis Transcriptómico

Como se ha mencionado previamente, los factores Gre han sido ampliamente estudiados en *E. coli*, sin embargo antes de realizar este trabajo, poco o nada se conocía acerca del impacto que tienen en la fisiología de *Salmonella*. Estudios en *E. coli*, comparando el patrón de expresión de una cepa mutante *greB* respecto a una cepa mutante *greAgreB* en fase exponencial de crecimiento, indican que GreA activa la expresión transcripcional de 19 genes, involucrados en diferentes categorías funcionales como la síntesis de proteínas ribosomales, respiración celular y metabolismo. También observaron que GreA reprime 82 genes distribuidos en diferentes categorías funcionales, por lo que atribuyeron a GreA una función represora en la expresión génica de *E. coli* (Stepanova *et al.*, 2007). Además del papel en el control transcripcional, atendiendo a que la sobreexpresión de GreA permite a la célula sobrevivir durante shock térmico y estrés oxidativo, se ha atribuido a GreA un posible papel como chaperona, estabilizando diferentes proteínas en *E. coli*. Por tanto, GreA también podría tener un efecto a nivel post-transcripcional con consecuencias en la fisiología de la célula (Li *et al.*, 2012).

En el caso de *S. pneumoniae*, que presentan un único factor Gre, la delección de éste causa que más del 25 % del genoma sea expresado diferencialmente en más de dos veces respecto a la cepa WT. Aproximadamente la mitad de estos genes son estimulados y la otra mitad reprimidos (Yuzenkova *et al.*, 2014). Interesantemente, en varios géneros bacterianos como las cianobacterias y en otros grupos como Aquificaceae, Dictyoglomaceae y Fusobacteriaceae, los genes que codifican para los factores Gre están ausentes; sugiriendo que las características específicas de sus ARNpol pueden compensar la ausencia de estos factores (Stepanova *et al.*, 2009).

En apartados anteriores de este trabajo, se ha demostrado mediante análisis fenotípicos y ensayos transcripcionales, el importante papel que desempeñan los factores Gre en la regulación de la motilidad, la virulencia y la capacidad de



formar biofilm en *Salmonella*. Para profundizar en la regulación génica ejercida por los factores Gre en *Salmonella*, se realizaron análisis transcriptómicos mediante la técnica de microarrays. Para ello, se aisló ARN total a partir de cultivos de las cepas WT (SV5015) y mutantes *greA* (TGC-1), *greB* (TGC-2) y *greAgreB* (TGC-3) crecidos en LB a 37 °C a inicios de fase estacionaria ( $DO_{600nm}$  de 2,0). El análisis transcriptómico se llevó a cabo utilizando *custom arrays* de ADN de la cepa de *Salmonella* Typhimurium SL1344, fabricados por NimbleGen. Estos microarrays permiten detectar las 4941 pautas de lectura abierta (ORF) de la secuencia genómica de la cepa SL1344 (4519 del cromosoma de SL1344 (NC\_016810) y 103, 99, 14 y 206 de los plásmidos pSLT (AE006471), pCol1B9 (HE654725), pRSF1010 (HE654726) y R27 (AF250878), respectivamente). La detección de cada ORF se realiza por duplicado mediante hibridación a 7 sondas independientes. Se debe indicar que las cepas utilizadas no contenían el plásmido conjugativo R27 y, por tanto, no se muestra ningún resultado con las correspondientes sondas. A partir de 25 ng de ARN total de la cepa de interés se obtuvieron las librerías de ADNc. El marcaje con nonámeros de Cy3 y la hibridación, se realizaron siguiendo las indicaciones de Roche NimbleGen (NimbleGen arrays users guide v6.0). La corrección, normalización y manipulación de los datos fue realizada en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRBB).

### **4.4.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en el patrón global de expresión de *Salmonella***

Los valores presentados en la tabla S1 (material suplementario adjunto en la memoria USB) corresponden a la diferencia de expresión (FC, del inglés *Fold Change*) de todos los genes de SV5015 en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, respecto a la cepa WT, respectivamente. Inicialmente, para el análisis de los genes afectados se tuvieron en consideración los genes que presentaron un FC entre 2 y -2, en las cepas mutantes para los factores Gre, respecto a la cepa WT. Los genes con un FC igual o inferior a -2 son los genes que muestran una menor expresión (*down*) en las cepas mutantes y por lo tanto son genes cuya expresión está estimulada directa o indirectamente por el factor en cuestión

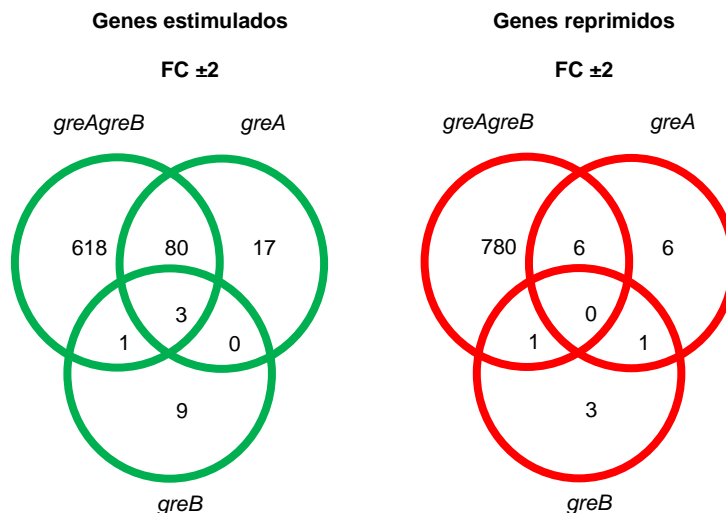
(GreA, GreB o los factores Gre en general). De la misma manera, genes con un FC igual o superior a 2 son genes que muestran una mayor expresión (*up*) en las cepas mutantes y que por lo tanto se encuentran reprimidos directa o indirectamente por los factores Gre. Es difícil imaginar cómo los factores Gre pueden reprimir la expresión génica cuando se han descrito como factores que promueven la resolución de situaciones de pausa durante la elongación de la transcripción. Como se discutirá más adelante, probablemente en muchos de estos genes el efecto de los factores Gre es indirecto. No obstante en el texto se hablará de genes reprimidos por los factores Gre al referirse a aquellos con un  $FC \geq 2$ .

Los resultados obtenidos claramente muestran que las mutaciones simples *greA* y *greB*, presentan un menor porcentaje de genes afectados que la doble mutación *greA greB* (tabla 4.2). En la cepa mutante *greA* 113 genes se encuentran afectados, siendo estos el 2,3 % del total de genes de *Salmonella*. La mayoría, 100, son genes estimulados por GreA, detectándose solo 13 genes reprimidos por dicha proteína. Si bien, en *E. coli*, se detectaba mayoritariamente un efecto represor de GreA, éste no es el caso en *Salmonella*, donde de hecho se detectan más genes estimulados que reprimidos. Por su parte, en la mutación *greB* se encuentran afectados 18 genes, representando el 0,38 % del total de genes. De estos 18 genes, 13 son estimulados y 5 reprimidos por GreB. En la cepa doble mutante *greA greB* los genes afectados representan el 32 % (1489) del total de genes. De éstos la mitad están estimulados y la otra mitad reprimidos por los factores Gre.

**Tabla 4.2.** Total de genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greA greB* respecto a la cepa salvaje. Comparaciones realizadas con un FC entre 2 y -2. Genes “Down”: genes estimulados por los factores Gre. Genes “Up”: genes reprimidos por los factores Gre. Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto al total de genes presentes en el genoma.

Mutación	<i>greA</i>	<i>greB</i>	<i>greA greB</i>	Total de genes
Down (%)	100 (2,1)	13 (0,3)	702 (14,8)	
Global Up (%)	13 (0,3)	5 (0,1)	787 (16,6)	4735
Total (%)	113 (2,4)	18 (0,4)	1489 (31,4)	

En la figura 4.42 se muestra mediante diagramas de Venn la distribución de los genes afectados en las diferentes cepas mutantes analizadas.



**Figura 4.42.** Total de genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB* en SV5015. Comparaciones realizadas con un FC de  $\pm 2$ .

En la distribución de los genes se ha diferenciado entre estimulados y reprimidos. Si se analiza el diagrama de Venn de los genes estimulados, se observa una serie de datos interesantes. Como sería de esperar, la mayoría de los genes afectados en la cepa mutante *greA* también se encuentran afectados en mutante *greAgreB* (83 de 100 genes). Resulta curioso que, por tanto, haya 17 genes cuya expresión se ve afectada en ausencia de GreA, solo cuando GreB está presente. Esto sugeriría que GreB es responsable directo o indirecto del efecto observado. No obstante, ninguno de estos 17 genes muestra afectación en ausencia de GreB si GreA está presente. En la tabla 4.3, se muestran estos 17 genes afectados en la cepa mutante *greA*. La mayoría de estos genes estimulados por GreA están codificados en la SPI- 2.

**Tabla 4.3.** Genes afectados únicamente en la cepa mutante *greA*. En verde se indican los genes estimulados (17 genes) y en rojo los genes reprimidos (6 genes) por la proteína GreA.

Categoría funcional	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
Gifsy-2	SL0948	<i>ydaE</i>	-2,04	-1,32	-1,12
	SL0952	<i>ydaU</i>	-2,00	-1,28	-1,62
	SL0995	-	-2,02	-1,28	-1,84
	SL1335	<i>sseD</i>	-5,29	1,33	-1,44
	SL1336	<i>sseE</i>	-4,59	1,21	-1,28
	SL1337	<i>sscB</i>	-5,73	1,14	-1,55
	SL1338	<i>sseF</i>	-2,64	-1,03	-1,30
SPI-2	SL1339	<i>sseG</i>	-2,53	-1,17	-1,36
	SL1340	<i>ssaG</i>	-4,80	1,60	-1,67
	SL1348	<i>ssaV</i>	-2,98	1,24	-1,41
	SL1349	<i>ssaN</i>	-3,19	1,27	1,14
	SL1350	<i>ssaO</i>	-3,52	1,44	1,32
	SL1351	<i>ssaP</i>	-2,62	1,21	-1,05
	SL1352	<i>ssaQ</i>	-2,23	1,24	1,11
Síntesis de proteínas	SL2114	<i>cesT</i>	-3,66	1,12	-1,47
Fels-2	SL2703	<i>ybil</i>	-2,29	-1,54	-1,69
Envuelta celular	SL2756	<i>fljB</i>	-2,40	-1,63	-1,84
Hipotética	SL3270	<i>yhbY</i>	2,18	1,01	1,19
Transporte y unión de proteínas	SL4236	<i>melB</i>	2,07	-1,79	1,46
Biosíntesis de aminoácidos	SL4393	<i>argR</i>	2,49	1,35	-1,35
Envuelta celular	SL4394	<i>yfcC</i>	2,59	1,62	-1,71
Regulación	SL4395	<i>arcB</i>	2,46	1,57	-1,54
Metabolismo energético	SL4396	<i>arcC</i>	2,65	1,92	-1,01

Por otro lado, se observa que de los 13 genes estimulados por GreB solo 4 de ellos se ven igualmente afectados en la cepa doble mutante. De los 9 genes restantes (tabla 4.4), 5 de ellos muestran un comportamiento inverso en la cepa doble mutante *greAgreB*, al detectarse un muy importante incremento de su expresión. Resulta también curioso que únicamente la expresión de 3 genes se encuentre afectada en las 3 cepas: *greA*, *greB* y *greAgreB*. Estos 3 genes son: *yjjQ*, que codifica para una proteína reguladora de la familia GerE; *fljA*, un represor de la flagelina; y un gen sin función conocida que codifica para una proteína citoplasmática.

**Tabla 4.4.** Genes afectados en la cepa mutante *greB*. En verde se indican los genes estimulados (9 genes) y en rojo los genes reprimidos (3 genes) por la proteína GreB o los factores Gre en general.

Categoría funcional	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
Transporte y unión de proteínas	SL0651	<i>gltL</i>	-1,77	-2,15	8,59
	SL0652	<i>gltK</i>	-1,72	-2,00	8,36
Metabolismo energético	SL1045	<i>hpcH</i>	-1,41	-2,00	3,02
	SL1239	<i>astA</i>	-1,37	-2,03	26,67
Función desconocida	SL1242	<i>astE</i>	-1,19	-2,02	8,31
No clasificado	SL1484	-	-1,18	-2,93	-1,44
Metabolismo energético	SL1501	<i>fdnG</i>	-1,29	-2,04	1,12
	Fels-1	-	-1,41	-2,00	1,55
Función desconocida	SL2739	<i>hxlA</i>	1,52	2,29	1,14
	SL3471	<i>yhgF</i>	-1,23	2,01	-1,52
Transporte y unión de proteínas	SL4167	<i>malk</i>	-1,91	-2,04	1,67
	pSLT	SLP1_0086	<i>papB</i>	1,95	2,29

En el caso de los genes reprimidos, en la cepa *greA* se encontraron 13 genes de los cuales 6 también están reprimidos en la mutante *greAgreB* y uno que también se detecta en la cepa *greB* pero no en la doble mutante. Los genes reprimidos solo en la cepa mutante *greA* están distribuidos en diferentes categorías funcionales como biosíntesis de aminoácidos, envuelta celular, regulación y transporte de proteínas (tabla 4.3). De forma similar, de los 5 genes reprimidos por GreB, 3 de ellos solo se detecta el efecto en la cepa mutante *greB* (tabla 4.4), 2 sin función descrita y el restante está codificado en el plásmido pSLT. Si bien, no se encontró ningún gen que esté reprimido por GreA, GreB y ambos factores Gre a la vez.

Una posible explicación para que un gen solo se vea afectado en la cepa mutante *greA* o mutante *greB* sería si el efecto de esta mutación es promover la interacción del factor Gre restante con la ARNpol y esto causara una alteración de la expresión génica. Obviamente al faltar el segundo factor se deja de detectar el efecto en la expresión. Estos fenómenos de competencia entre proteínas que

interaccionan con el canal secundario de la ARNpol podrían explicar el comportamiento dispar en las diferentes mutantes.

#### 4.4.1.1 Efecto de las mutaciones en los factores Gre en el patrón de expresión del *core genome* y genes transferidos horizontalmente en *Salmonella*

Los genes afectados en las diferentes cepas mutantes fueron clasificados dependiendo de si forman parte del *core genome*, que representa los genes comunes entre diferentes cepas de una especie, o si son genes HGT (*horizontal gene transfer*), es decir, que han sido adquiridos durante diferentes procesos de intercambio génico horizontal. En *S. Typhimurium* SL1344 se consideran HGT aquellos genes presentes en plásmidos, islas de patogenicidad, bacteriófagos, transposones y el operón *cob/pdu*, haciendo un total de 603 genes. Consecuentemente, un total de 4132 genes fueron atribuidos al *core genome*. En la tabla 4.5 se muestra el total de genes afectados del *core genome* y de la categoría HGT, en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*.

**Tabla 4.5.** Genes afectados en *core genome* y HGT en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, respecto a la cepa WT. Comparaciones realizadas con un FC entre 2 y -2. Genes “Down”: genes estimulados por los factores Gre. Genes “Up”: genes reprimidos por los factores Gre. Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto al total de genes presentes en *core genome* y HGT, respectivamente.

Mutación		<i>greA</i>	<i>greB</i>	<i>greAgreB</i>	Total de genes
<i>Core genome</i>	Down (%)	36 (0,9)	12 (0,3)	520 (12,6)	4132
	Up (%)	13 (0,3)	4 (0,1)	708 (17,1)	
	Total (%)	49 (1,2)	16 (0,4)	1228 (29,7)	
HGT	Down (%)	64 (10,6)	1 (0,2)	182 (30,2)	603
	Up (%)	0	1 (0,2)	79 (13,1)	
	Total (%)	64 (10,6)	2 (0,4)	261 (43,3)	

En los genes pertenecientes al *core genome* de *Salmonella*, se puede observar que GreA y GreB por separado estimulan más genes (GreA 36 y GreB 12) de los que reprimen (GreA 13 y GreB 4). Sin embargo, en la cepa doble mutante

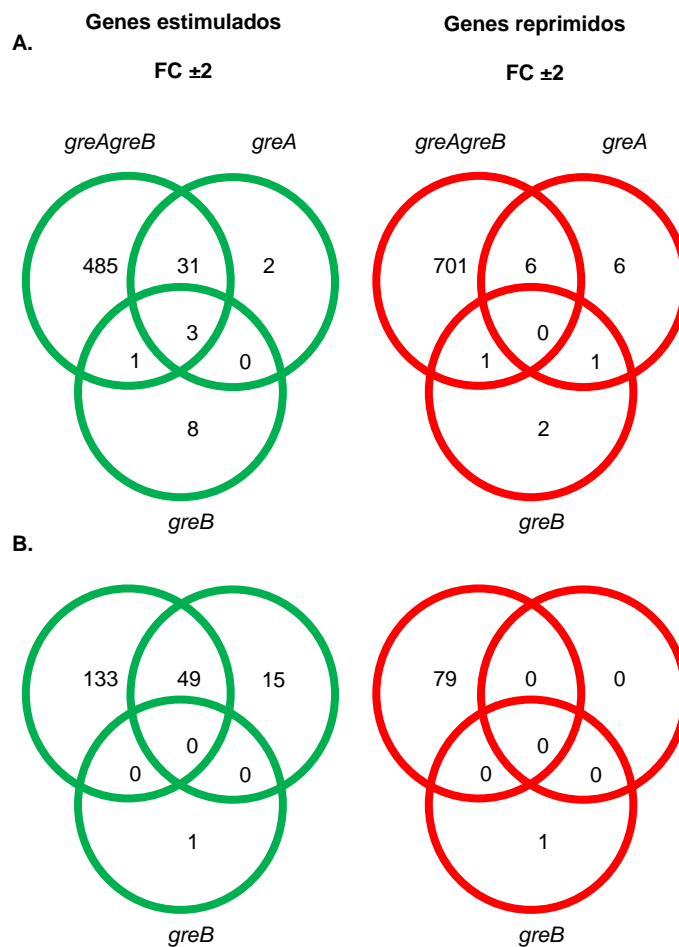
*greAgreB* hay mayor número de genes reprimidos por los factores Gre (708, 17,1 %) que estimulados por los mismos (520, 12,6 %). También se observa que en la cepa mutante *greA* hay un número considerable de genes reprimidos en el *core genome* (13), situación que no se observa en el caso de los genes HGT, donde todos los genes afectados en la mutante *greA* se encuentran estimulados por GreA. Por su parte GreB afecta un número muy bajo de genes HGT estimulando un gen y reprimiendo otro. El porcentaje de genes HGT estimulados (30,2 %) por ambos factores Gre es mayor que los genes reprimidos (13,1 %). Al comparar entre HGT y el *core genome*, se observa que los resultados en las cepas mutantes *greA* y *greAgreB* claramente sugieren un papel destacado de GreA y en general los factores Gre en la regulación de los genes HGT de la célula. Del 12,7 % de genes de todo el genoma que corresponde al porcentaje de genes HGT, el 43,3 % están afectados en la cepa mutante *greAgreB* y cuando se observa únicamente la cepa *greA*, hay más genes afectados en HGT (64) que en el *core genome* (49). Además, el efecto de los factores Gre sobre el *core genome* parece ser diferente respecto al efecto que ejercen en genes HGT. Los factores Gre estimulan de manera importante los genes HGT, mientras que en los genes del *core genome* parecen ejercer un efecto represor más relevante.

En la figura 4.43 se muestra mediante diagramas de Venn la distribución de los genes afectados del *core genome* (A) y HGT (B) en las diferentes cepas mutantes analizadas. Respecto al *core genome*, al observar únicamente la mutante *greA* hay un bajo número de genes afectados (2 estimulados y 6 reprimidos) (tabla 4.3). Los genes del *core genome* estimulados únicamente por GreA son: *cesT* y *fljB* que codifican para una proteína chaperona del T3SS y una flagelina cuya función es polimerizar los filamentos del flagelo, respectivamente. Los genes del *core genome* reprimidos únicamente por GreA son: *arcC*, *yfcC*, *argR*, *arcB*, *yhbY* y *melB*, involucrados en diferentes categorías funcionales como transporte de proteínas, biosíntesis de aminoácidos y regulación. En el caso de los genes del *core genome* afectados en la mutante *greB*, se observa que hay más genes estimulados (8) que reprimidos (2) (tabla 4.4). Los genes estimulados únicamente por GreB son: *gltL*, *gltK*, *hpcH*, *astA*, *astE*, SL1344\_1484, *fdnG* y *malk*, involucrados en transporte de proteínas y

metabolismo energético. Los genes reprimidos únicamente por GreB son: *hlxA* y *yhgF* de función desconocida.

Respecto a los genes HGT, los genes fueron clasificados dependiendo de su origen en las siguientes categorías: plásmidos (pSLT, pCol1B y pRSF1010), operón *cob/pdu*, fagos (Gifsy 1 y 2, Fels 1 y 2, profago remanente inactivo y SLP203) e islas de patogenicidad (SPI-1 a 5) (tabla S4 del anexo). En la figura 4.43 B se observa que en la cepa mutante *greA*, hay un total de 64 genes afectados, siendo todos ellos estimulados por GreA. De estos, 49 también se encuentran afectados en la cepa mutante *greAgreB*, indicando que hay 15 genes HGT cuya expresión solo se ve detectada en ausencia de GreA y en presencia de GreB, y que corresponden a 3 genes del fago Gifsy-2, 11 genes de la SPI-2 y un gen del fago Fels-2 (tabla 4.3). La mayoría de los genes de SPI-2, 31 de 33 están afectados por GreA. La SPI-2 codifica para factores implicados en la vida intracelular. Los 33 genes restantes se localizan mayoritariamente en diferentes fagos presentes en el genoma de *Salmonella*, especialmente en Gifsy-1 y Gifsy-2 (tabla S4 del anexo). En el caso de la cepa mutante *greB*, se observa que GreB no tiene un efecto relevante sobre los genes HGT ya que afecta únicamente a 2 genes: uno reprimido y otro estimulado. El gen estimulado, perteneciente al fago Fels-1, no tiene función conocida. El gen reprimido es *papB* perteneciente al plásmido pSLT, que codifica para una proteína reguladora de la transcripción. La expresión de estos dos genes no se ve afectada en la cepa doble mutante *greAgreB*. En el caso de la cepa mutante *greAgreB*, se observa que 182 genes HGT son estimulados por los factores Gre y 79 son reprimidos por los mismos. Los factores Gre actúan en general como estimuladores de la expresión de islas de patogenicidad y el operón *cob/pdu*, así como de los genes de algunos fagos como Gifsy-1 y Gifsy-2 (tabla S4 del anexo). Por otro lado en relación a los genes reprimidos en la doble mutante *greAgreB*, 46 de los 79 genes reprimidos se encuentran distribuidos en los plásmidos pRSF1010, pSLT y pCol1B. También se detecta efecto negativo en la expresión de genes de ciertos fagos como SLP203, Fels-1 y el profago remanente inactivo. Los detalles de los genes HGT afectados por la doble mutante *greAgreB* se especifican en el apartado 4.4.2.2.





**Figura 4.43.** Genes del *core genome* (A) y HGT (B) afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB* en SV5015. Comparaciones realizadas con un FC de  $\pm 2$ .

En general, se puede concluir que utilizando un FC entre 2 y -2, en las cepas mutantes simples se encuentran afectados un número reducido de genes de *Salmonella*, en comparación con la cepa doble mutante *greAgreB*, debido posiblemente a que las proteínas GreA y GreB pueden ejercer un papel redundante sustituyendo entre sí sus funciones. Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros estudios, donde la delección de GreB no presenta un fenotipo relevante, mientras que la eliminación de ambas proteínas ejerce un efecto importante en la fisiología de la célula (Stepanova *et al.*, 2007). Por ejemplo en *E. coli*, la cepa doble mutante *greAgreB* no es capaz de sobrevivir a altas temperaturas, mientras que los mutantes simples sí (Orlova *et al.*, 1995). En *Salmonella* el efecto limitado de las mutaciones simples respecto a la cepa doble mutante fue detectado al analizar diferentes procesos celulares como la

invasión o el crecimiento en forma de biofilm (apartados 4.2.1 y 4.3). Los siguientes apartados estarán enfocados en el estudio del efecto de la mutación en ambos factores Gre (cepa *greAgreB*) en la expresión transcripcional de los genes de *Salmonella*.

#### 4.4.2 Genes expresados diferencialmente en la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa salvaje

Debido al elevado número de genes afectados en la cepa *greAgreB* (1489), para estos estudios se analizó únicamente los genes con un FC de  $\pm 3$ . No se utilizó este FC en los análisis previos ya que en los mutantes simples utilizando un FC de  $\pm 3$  el número de genes afectados es muy bajo, 42 genes afectados en *greA* (0,9 %) y un único gen afectado en la mutante *greB*.

En la tabla S2 (material suplementario adjunto en la memoria USB) se muestra el total de genes afectados en la doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT, bajo las condiciones de crecimiento indicadas. Utilizando un FC de  $\pm 3$  (tabla 4.6), los factores Gre afectaron 681 genes representando el 14,4 % de los genes que componen el genoma de SV5015. De estos 681 genes, 322 son estimulados y 359 reprimidos por los factores Gre. Dicho de otra manera, del total de genes afectados en *S. Typhimurium* SV5015, aproximadamente el 50 % están estimulados y el 50 % reprimidos bajo estas condiciones experimentales. Es importante resaltar que el porcentaje de genes afectados por los factores Gre, respecto al total de genes de *Salmonella*, disminuye cerca de 2 veces utilizando este rango de FC  $\pm 3$  (14,3 %), comparado con el FC de  $\pm 2$  (32 %). Tal y como se había concluido con el análisis a un FC de  $\pm 2$ , los factores Gre continúan mostrando un efecto evidente sobre los genes HGT, afectando a más del 25 % de los genes, comparando con los genes afectados del *core genome* que representan menos del 15 %.

**Tabla 4.6.** Total de genes afectados en la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT. Comparaciones realizadas con un FC entre 3 y -3. Genes “Down”: genes estimulados por los factores Gre. Genes “Up”: genes reprimidos por los factores Gre. Entre paréntesis se indica el

## Resultados

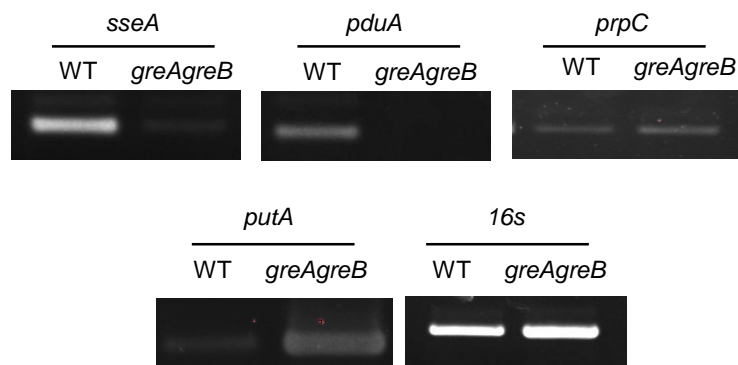
porcentaje respecto al total de genes presentes en el genoma, el *core genome* y HGT, respectivamente.

Mutación		<i>greAgreB</i>	Total de genes
Global	Down (%)	322 (6,8)	4735
	Up (%)	359 (7,6)	
	Total (%)	681 (14,4)	
<i>Core genome</i>	Down (%)	193 (4,7)	4132
	Up (%)	335 (8,1)	
	Total (%)	528 (12,8)	
HGT	Down (%)	129 (21,4)	603
	Up (%)	24 (4)	
	Total (%)	153 (25,4)	

En el caso del *core genome*, se observa que los factores Gre estimulan aproximadamente la mitad (193 genes) de los genes que reprimen (355 genes), siguiendo el mismo patrón observado en los análisis realizados con un FC de  $\pm 2$ , pero haciéndose más evidente que los factores Gre están ejerciendo un mayor efecto represor en los genes del *core genome*. Por su parte, la mayoría de los genes transferidos horizontalmente (129) son estimulados por los factores Gre, diferencia que también se ve más marcada que con un FC de  $\pm 2$ , pues los genes estimulados representan el 84,3 % de los genes HGT afectados con un FC de  $\pm 3$ , mientras que representaban el 69,7 % con un FC de  $\pm 2$ . Estos 129 genes representan más de un 20 % de los genes HGT. Estos resultados claramente indican que los factores Gre son especialmente requeridos para la correcta expresión de los genes HGT.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los microarrays, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR de algunos genes afectados en la cepa doble mutante *greAgreB*. Para ello se escogieron genes que se encontraban estimulados por los factores Gre, como es el caso de *sseA* y *pduA*. *sseA* codifica para SseA, una chaperona del sistema de secreción codificado en la SPI-2 (T3SS-2) (Zurawski & Stein, 2003). La proteína PduA codificada en el operón *pdu*, que junto con el operón *cob* codifican proteínas responsables de la síntesis y degradación del propanediol, y la síntesis de cobalamina (vitamina B12) (Chen

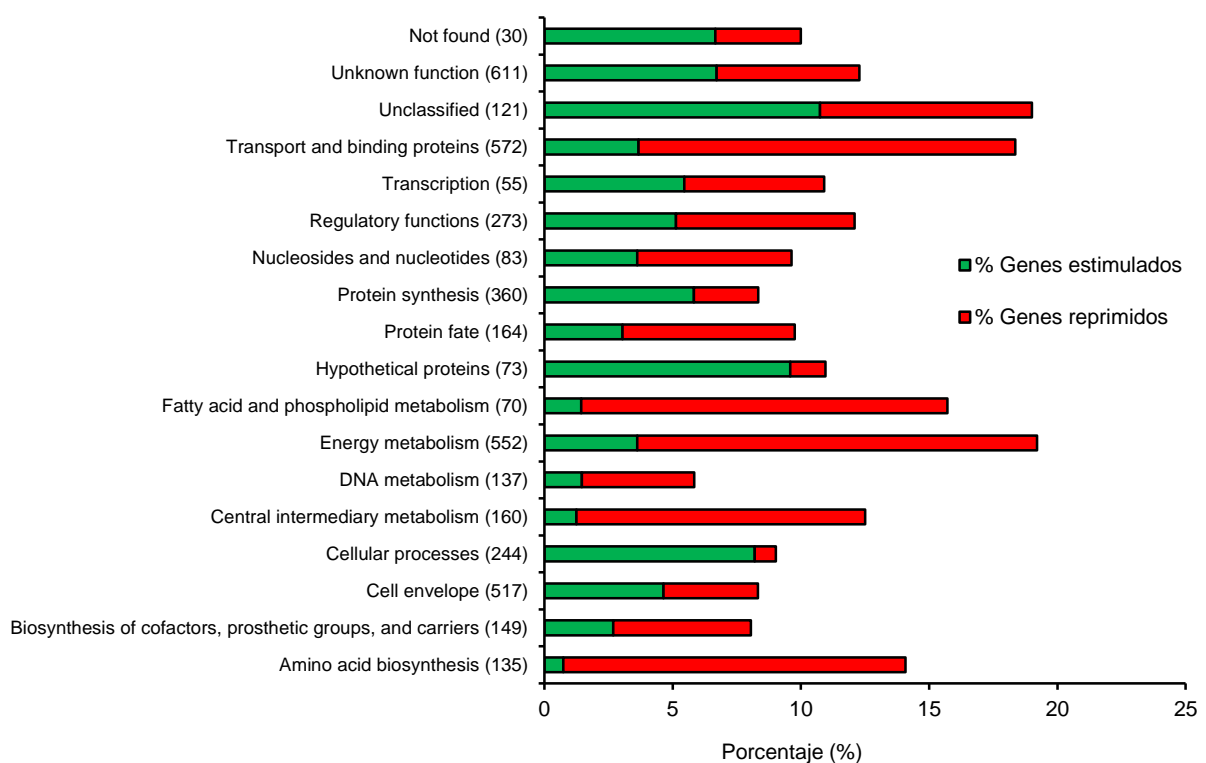
*et al.*, 1994). También se escogieron genes que resultaron reprimidos por los factores Gre, como es el caso de *prpC* y *putA* que codifican para una citrato sintetasa y una proteína bifuncional implicada en la degradación de aminoácidos, respectivamente. Los ensayos se realizaron con el ADNc retrotranscrito de las muestras de ARN total utilizadas para el análisis transcriptómico por microarrays de las cepas WT y mutante *greAgreB*. El gen 16s fue utilizado como control de expresión. Los resultados muestran correspondencia con los datos derivados del microarray ya que en la cepa doble mutante *greAgreB* la expresión de los genes *sseA* y *pduA* se encuentra drásticamente reducida respecto a la cepa WT y la expresión de los genes *prpC* y *putA* es mayor en la cepa mutante que en WT (figura 4.44).



**Figura 4.44.** Análisis transcripcional mediante RT-PCR de los genes *sseA*, *pduA*, *prpC* y *putA*. Las cepas WT (SV5015) y *greAgreB* (TGC-3) fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0, tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. A partir del sedimento obtenido tras centrifugar los cultivos bacterianos se aisló ARN total. Este ARN, a diferentes concentraciones según la pareja de oligonucleótidos a utilizar, fue retrotranscrito a ADNc y se realizó una PCR con los oligonucleótidos *sseA*For/*sseA*Rev, *pduA*For/*pduA*Rev, *prpC*For/*prpC*Rev, *putA*For/*putA*Rev y Sall16s/Sall116s para los genes *sseA*, *pduA*, *prpC*, *putA* y 16s (control), respectivamente. El ADNc fue visualizado mediante una electroforesis en genes de agarosa al 2 % tras una tinción con bromuro de etidio.

#### 4.4.2.1 Efecto de los factores Gre en la expresión del *core genome* de *Salmonella*

Para analizar el efecto de los factores Gre en el *core genome* de SV5015, los genes fueron distribuidos en diferentes categorías funcionales de acuerdo a la clasificación de JCVI (*J. Craig Venter Institute*) para las ORF de *S. Typhimurium* LT2 (Torrieri *et al.*, 2012) (tabla S3 del anexo). En la figura 4.45 se muestra el porcentaje de genes afectados (FC  $\pm 3$ ) en la mutante *greAgreB* respecto al total de genes de cada categoría funcional.



**Figura 4.45.** Porcentaje de genes afectados en cada categoría funcional del *core genome* de *Salmonella*, en la cepa doble mutante *greAgreB*. Las barras verdes representan la proporción de genes estimulados, y las barras rojas la proporción de genes reprimidos, por los factores Gre con un FC de  $\pm 3$ . Entre paréntesis se indica el número de genes pertenecientes a cada categoría funcional. Los porcentajes fueron calculados respecto al total de genes de cada categoría funcional. La clasificación de los genes en categorías funcionales se realizó según (Torrieri *et al.*, 2012).

Las categorías funcionales en las cuales el porcentaje de genes estimulados por los factores Gre fue mayor que el porcentaje de genes reprimidos por los mismos, fueron:

1. Procesos celulares: un total de 20 genes estimulados de los 244 genes (8,1 %) que componen la categoría. Entre los que se encuentran muchos genes involucrados en motilidad y quimiotaxis (*motA* y *motB*, *flhC*, *fliS*, *fliT* y *fliA*, *cheB*, *cheR* y *cheV*), y genes estructurales implicados en la síntesis de fimbrias tipo I como *fimI*, *fimD* y *fimH*. También genes reguladores de la expresión de las fimbrias tipo I como *fimZ* y *fimY*. El hecho de que los factores Gre estimulen genes involucrados en motilidad, se correlaciona con los resultados presentados en el apartado 4.1.3.2 donde se describe la importancia de los factores Gre en la motilidad de *Salmonella*. En esta categoría también se encuentran genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en *Salmonella* como el gen *ahpC* miembro del regulón de estrés por peróxido de hidrógeno que se encuentra estimulado con un FC de -2,76. Resultados que se correlacionan con los del apartado 4.1.3.3 donde se demostró que los factores Gre de *Salmonella* estarían de alguna manera implicados en el control de la respuesta al estrés oxidativo.
2. Síntesis de proteínas: un total de 21 genes estimulados de 360 genes (5,8 %) que componen la categoría. Entre los genes estimulados se encuentran *rpsT* y *rpsU* que codifican para proteínas de la subunidad 30s del ribosoma, genes *yadB* y *argS*, que codifican para glutamil y arginil-ARNt sintetasas, proteínas capaces de catalizar la unión de un aminoácido a su correspondiente ARNt.
3. Envuelta celular: un total de 24 genes estimulados de 517 genes (4,6 %) que componen la categoría. En esta categoría también se encuentran estimulados genes estructurales implicados en la síntesis de fimbrias tipo I como *fimC* y *fimA*, así como genes que codifican para lipoproteínas como *envE* y *envF*, entre otros.

En general se podría decir que, entre los genes del *core genome* estimulados, se resaltan aquellas funciones relacionadas con la interacción con el medio extracelular (procesos celulares y envuelta celular), así como la síntesis proteica.

Las categorías funcionales en las cuales el porcentaje de genes reprimidos por los factores Gre fue mayor que el porcentaje de genes estimulados por los mismos están relacionadas con el metabolismo celular. En más detalles estas categorías fueron:

1. Metabolismo energético: un total de 86 de los 552 genes (15,6 %) que componen la categoría, se encontraron reprimidos posiblemente de forma indirecta por los factores Gre. Con un FC superior a 8, se destacan los genes *cyoC* y *cyoB* que codifican para proteínas implicadas en la transferencia de electrones en la oxidación de prolina a citocromo *b<sub>o</sub>*. También se destacan los genes *sdhA*, *sdhB* y *sdhC* que juegan un papel importante en el ciclo de Krebs. El gen *hutH* implicado en la degradación de histidina y los genes *astA* y *astD* cuyo operón está implicado en la degradación de arginina. Otros genes como *rbsK*, *rspB*, *dadA*, *ansB*, *frlD* y *ulaA* están implicados en diferentes vías del metabolismo energético de *Salmonella*.
2. Transporte y unión de proteínas: se encontraron un total de 84 genes reprimidos de los 572 genes (14,7 %) que componen la categoría. Se destaca el operón *gltJKL* que codifica para proteínas transportadoras de la familia ABC. También se encontraron genes como *iaaA*, *gsiA* y *gsiB* implicados en la biosíntesis de aspartato y asparragina. El operón compuesto por los genes *opuBA*, *opuCB*, *opuCC* y SL1424 que codifica para proteínas implicadas en el transporte de glicina y el operón *mgICA* con proteínas implicadas en el transporte de carbohidratos.
3. Biosíntesis de aminoácidos: 18 de 135 genes (13,3 %) se encontraron reprimidos por los factores Gre. Se destacan genes altamente reprimidos como el *astC* y *gdhA* que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de aminotransferasas y glutamato deshidrogenasas.

4. Metabolismo intermediario central: 18 de 160 genes (11,25 %) se encontraron reprimidos por los factores Gre. Entre los cuales se destaca el operón *cysDNC* cuyos genes codifican proteínas que participan en la asimilación del sulfato y la biosíntesis de cisteína. Y otros genes como *gabD*, *gabT*, *betC*, *fadE*, *gcl* y *gip* que codifican proteínas implicadas en actividades sulfatasas, oxidoreductasas, la síntesis de citocromos y cadenas respiratorias reductoras de nitrato.
5. *Protein fate*: se encontraron 11 genes reprimidos de los 164 genes (6,7 %) que componen la categoría, cuya expresión se encuentra reprimida por los factores Gre. Dentro de los cuales se destaca *htpG*, que codifica para una proteína chaperona involucrada en la respuesta a estreses ambientales (altas temperaturas). También se destaca el gen *dsbA*, que codifica para la proteína del mismo nombre, necesaria para la formación de enlaces disulfuro en algunas proteínas de la envuelta como PhoA o OmpA. Como se comentó en la introducción, la proteína DsbA es necesaria para la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora, ya que su ausencia bloquea los sistemas de secreción T3SS-1 y T3SS-2 de *S. Typhimurium*. Resulta curioso que *dsbA* se encuentre reprimido por los factores Gre, pues previamente hemos descrito que los factores Gre favorecen la secreción de los efectores del T3SS-1 y T3SS-2.
6. Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos, y transportadores: 8 de 149 genes (5,3 %) se muestran reprimidos por los factores Gre. En esta categoría se encuentran genes como los del operón *thiCEFSGH* que codifica proteínas necesarias para la síntesis de la fracción monofosfato de 4-metil-5-beta-hidroxietil tiazol de TPP (pirofosfato de tiamina). También se encuentra el gen *cyoE* que codifica para una proteína necesaria en la síntesis del grupo "heme" esencial para la respiración y en la defensa contra metabolitos tóxicos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
7. Metabolismo del ADN: 6 de 135 genes (4,3 %) se encontraron reprimidos de manera indirecta por los factores Gre. Estos genes son: *tus*, *hupB*, *yicR*, *yiaG*, *ulaA* y *glmS*, implicados en diferentes vías metabólicas del ADN como su replicación.



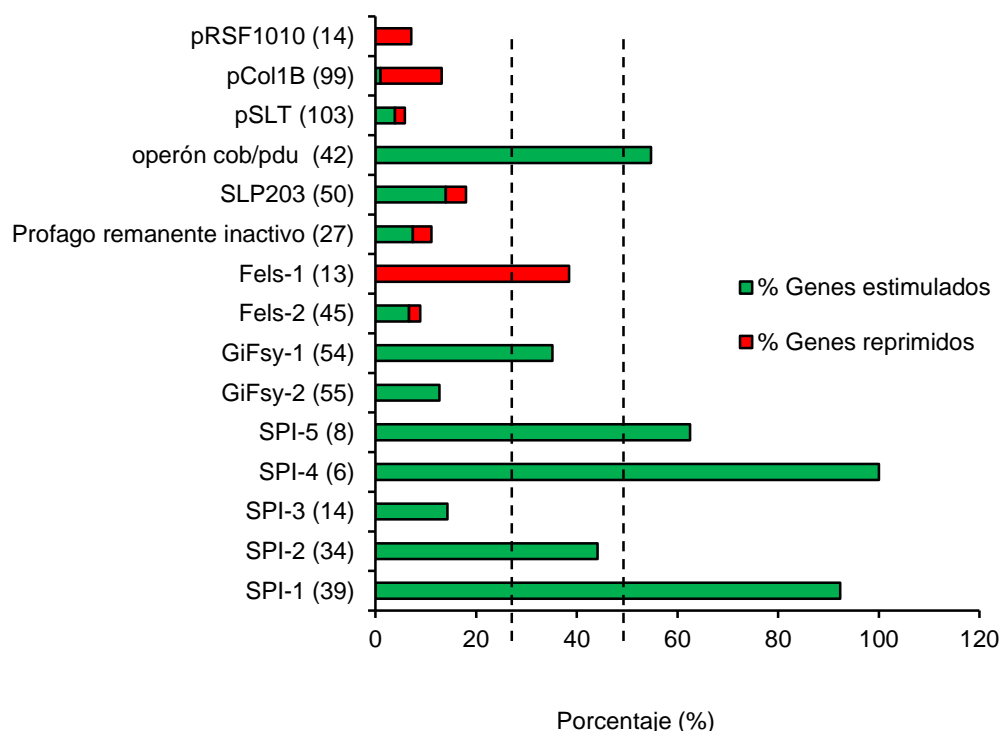
Dos categorías en las cuales el porcentaje de genes estimulados y reprimidos por los factores Gre se encuentra en proporciones similares (50-50 %) fueron:

1. Transcripción: en esta categoría se encontraron 3 genes estimulados y 3 genes reprimidos por los factores Gre de los 55 genes pertenecientes a esta categoría funcional (5,5 % de genes estimulados y 5,5 % de genes reprimidos). Los genes estimulados por los factores Gre fueron *rhIE* y *deaD* que codifican proteínas involucradas en la degradación del ARN, y el gen *rho* que codifica para el factor terminador de la transcripción Rho. Cabe resaltar que otros genes implicados en la degradación de ARN como *pcnB*, *rna*, *rnt*, *rnc*, *rph*, *rnpA* y *rhIB*, también se encontraban estimulados, aunque con un FC aproximado de -2. Sugiriendo que en general los factores Gre estimulan los genes relacionados con el procesamiento del ARN. Entre los genes reprimidos se destacan *citB* que codifica para una proteína reguladora de la transcripción y los genes *tctE* y *tctD* que codifican para una proteína sensor-quinasa de un sistema de dos componentes y su regulador transcripcional, respectivamente.
2. Funciones reguladoras: se encontraron 14 genes estimulados y 19 genes reprimidos por los factores Gre (5,1 % estimulados y 7% reprimidos) de los 273 genes que componen esta categoría. Se destacan entre genes estimulados por los factores Gre, el operón *rtsAB*. El gen *rtsA* (-47,96) que codifican para RtsA, proteína que induce la expresión de *HilA*, y *rtsB* (-60,33), que codifica para RtsB, implicada en la represión de la transcripción del operón *flhDC* que codifica para los genes flagelares. También se destaca el gen *araC*, que codifica para AraC, proteína reguladora del operón de la L-arabinosa, con un FC de -10. El gen *phoQ* que se ha descrito como regulador negativo de *hilA*, también se encontraba estimulado por los factores Gre aunque con un FC de -2,17. En esta categoría también se encuentran genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en *Salmonella* como el gen *soxS* que se encuentra estimulado por los factores Gre. La proteína SoxS se une a los promotores de muchos genes implicados en la regulación de la respuesta

al estrés oxidativo. Resultados también correlacionados con los del apartado 4.1.3.3 donde se demostró que los factores Gre de *Salmonella* estarían de alguna manera implicados en el control de la respuesta al estrés oxidativo.

#### 4.4.2.2 Efecto de los factores Gre en la expresión de los genes transferidos horizontalmente en *Salmonella*

Al igual que en el apartado anterior, se tuvieron en consideración los genes afectados con un FC de  $\pm 3$ . Los resultados indican que los factores Gre afectan la expresión del 25,4 % de los genes HGT de *Salmonella* y la mayoría de ellos (21,4 %) están estimulados (tabla 4.6). En la figura 4.46 se puede observar que hay elementos HGT que se encuentran ampliamente regulados por los factores Gre, teniendo más del 50 % de genes afectados, como las SPI-1, SPI-4, SPI-5 y el operón *cob/pdu*.



**Figura 4.46.** Porcentaje de genes transferidos horizontalmente afectados en la cepa doble mutante *greAgreB*. Las barras verdes representan la proporción de genes estimulados, y las barras rojas la proporción de genes reprimidos, por los factores Gre con un FC de  $\pm 3$ . Entre

paréntesis se indica el número de genes pertenecientes a cada categoría funcional. Los porcentajes fueron calculados respecto al total de genes de cada categoría funcional. La clasificación de los genes en categorías funcionales se realizó según (Torrieri *et al.*, 2012).

Otros elementos presentan cerca del 25 % de genes afectados como son la SPI-2 y los fagos Gifsy-1 y Fels-1. Con menos del 25 % de genes afectados se encuentran la SPI-3, los plásmidos pSLT, pCol1B y pRSF1010, y los fagos Gifsy-2, Fels-2, profago remanente inactivo y SLP203.

### **Islas de patogenicidad:**

**SPI-1:** 36 de sus 39 genes (92,3 %) son estimulados por los factores Gre. Los genes codificados en esta isla se han venido estudiando en más detalle en capítulos anteriores (apartado 4.2). Los ensayos de microarrays aquí presentados validan los resultados previamente descritos, que indican que los factores Gre regulan de manera positiva la expresión transcripcional de la mayoría de los genes de la SPI-1. Atendiendo a los resultados del apartado 4.2.4, ésta regulación está mediada por el control de la expresión del regulador HilD (figura 4.17A). Es importante destacar que 3 genes no estaban afectados, considerando un FC de  $\pm 3$  respecto a WT: *znuA* (-1,87), *sitB* (-1,80) y *sitC* (-1,60) implicados en el transporte de hierro. No se ha descrito si estos genes son dependientes o independientes de HilD y resulta interesante que el gen *sitD* implicado igualmente en el transporte de hierro si se encuentra afectado (-3,87).

**SPI-2:** Se observó que 15 de sus 34 genes (44 %) son estimulados por los factores Gre con un FC de  $\pm 3$ . La mayoría de estos genes codifican para proteínas que conforman el T3SS-2 de *Salmonella*. Resultados que se correlacionan con los descritos en el apartado 4.2.5 donde se muestra un importante efecto de los factores Gre en la regulación de SsrA (SpiR), proteína que regula la expresión de los genes del T3SS-2. Atendiendo a los resultados descritos, la regulación de la SPI-2 mediada por los factores Gre, sería consecuencia de la regulación de la expresión de HilD. Esta regulación de SsrA también se detectó mediante el análisis por microarrays. El 56 % restante de los genes presentes en la SPI-2, son genes estimulados por los factores Gre, pero

con un FC inferior a -3. En este grupo se encuentran genes que codifican para proteínas chaperonas y efectoras implicadas en virulencia. Es importante aclarar, que las condiciones utilizadas en el estudio de los microarrays no son especialmente permisivas para la expresión de los genes de la SPI-2, por lo que es posible que el porcentaje de genes afectados por los factores Gre y la intensidad de esta afectación, podría verse modificada significativamente en otras condiciones de crecimiento. En la siguiente tabla se presentan todos los genes de la SPI-2, organizados según la función que ejercen en la isla de patogenicidad. Se observa que los factores Gre afectan la expresión de genes tanto reguladores de la SPI-2, como proteínas efectoras, chaperonas y proteínas que forman parte del aparato del T3SS-2. Es interesante observar que los genes *ssrA* (*spiR*) y *ssrB*, reguladores principales de la SPI-2, presentan un FC de -2,56 y -2,58, respectivamente en la cepa doble mutante *greAgreB*, un nivel de expresión que no llega a -3 como ocurre con el resto de genes aguas abajo de *SsrA/B*.

**Tabla 4.7.** Genes presentes en la SPI-2. Se encuentran todos los genes organizados según su función en la SPI-2. En verde se indican los genes estimulados y en rojo los genes reprimidos.

Función	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
Putativa	SL1323	<i>ybgA</i>	1,18	1,12	2,23
	SL1324	<i>mlrA</i>	-1,84	-1,17	-2,75
Reguladores SPI-2	SL1325	<i>ssrB</i>	-2,38	1,75	-2,58
	SL1326	<i>spiR</i>	-3,42	1,76	-2,56
	SL1327	<i>spiC</i>	-7,40	1,17	-7,03
T3SS-2	SL1328	<i>spiA</i>	-8,81	1,31	-6,06
	SL1329	<i>ssaD</i>	-5,18	-1,04	-7,92
	SL1330	<i>ssaE</i>	-4,91	1,33	-4,88
Chaperona del T3SS-2	SL1331	<i>sseA</i>	-7,73	-1,03	-3,08
Proteínas efectoras	SL1332	<i>sseB</i>	-6,60	1,60	-2,69
Chaperona del T3SS-2	SL1333	<i>sscA</i>	-5,68	1,46	-2,44
Proteínas efectoras	SL1334	<i>sseC</i>	-6,74	1,31	-2,37
	SL1335	<i>sseD</i>	-5,29	1,24	-1,44
Aparato del T3SS-2	SL1336	<i>sseE</i>	-4,59	1,21	-1,28
T3SS-2	SL1337	<i>sscB</i>	-5,73	1,37	-1,55
	SL1338	<i>sseF</i>	-2,64	1,44	-1,30

## Resultados

Proteínas efectoras	SL1339	<i>sseG</i>	-2,53	1,27	-1,36
	SL1340	<i>ssaG</i>	-4,80	1,32	-1,67
T3SS-2	SL1341	<i>ssaH</i>	-14,29	1,26	-18,14
	SL1342	<i>ssaI</i>	-14,52	-1,14	-22,27
	SL1343	<i>ssaJ</i>	-15,99	-1,01	-17,00
Putativa	SL1344	-	-11,83	1,89	-16,48
	SL1345	<i>ssaK</i>	-11,43	1,31	-11,64
	SL1346	<i>ssaL</i>	-8,55	1,15	-5,60
	SL1347	<i>ssaM</i>	-8,23	1,13	-5,75
T3SS-2	SL1348	<i>ssaV</i>	-2,98	1,24	-1,41
	SL1349	<i>ssaN</i>	-3,19	1,26	1,14
	SL1350	<i>ssaO</i>	-3,52	-1,02	1,32
	SL1351	<i>ssaP</i>	-2,62	1,79	-1,05
	SL1352	<i>ssaQ</i>	-2,23	1,36	1,11
	SL1353	<i>yscR</i>	-8,10	1,14	-4,01
	SL1354	<i>ssaS</i>	-11,20	1,49	-6,62
	SL1355	<i>ssaT</i>	-4,96	1,21	-4,28
	SL1356	<i>ssaU</i>	-1,39	1,24	-1,11

**SPI-3:** Se encuentran afectados únicamente 2 de los 14 genes (14,2 %) que contiene esta isla. La expresión de *mgtB* y *mgtC*, que codifican para proteínas transportadoras de magnesio, está estimulada por los factores Gre. Entre los 12 genes restantes, hay unos que se encuentran estimulados y otros reprimidos con un FC  $\pm$  1,5 y la mayoría de ellos codifican para hipotéticas proteínas de función desconocida.

**SPI-4:** Los 6 genes presentes en esta isla se encuentran estimulados por los factores Gre, bajo las condiciones experimentales aquí establecidas. Esto resulta bastante interesante pues la SPI-4 codifica para un sistema de secreción de tipo I. y se cree que la proteína SiiE codificada en esta isla, actúa como una adhesina en células epiteliales durante el proceso de invasión. Estudios han demostrado una co-expresión de los genes de la SPI-1 y la SPI-4 durante la fase estacionaria de crecimiento, y que la expresión de los genes de la SPI-4 disminuye drásticamente en la ausencia de HilA (Gerlach *et al.*, 2007).

**SPI-5:** En esta isla 5 de sus 8 genes (62 %) se encuentran estimulados por los factores Gre. Entre ellos se encuentra el gen *sopB* que codifica para una proteína efectora secretada por el T3SS de la SPI-1.

**Plásmidos:**

En el caso de los plásmidos, en general el número de genes afectados fue considerablemente menor respecto al de las islas de patogenicidad. El plásmido pRSF1010 presenta un solo gen afectado de los 14 que codifica, el cual se encuentra reprimido por los factores Gre. Este gen es el *mobC* que codifica para una proteína de movilización. Cabe mencionar que 6 genes también se encuentran reprimidos y uno estimulado pero con un FC de  $\pm 2$ . El plásmido pCol1B presenta 12 genes reprimidos (12 %): *yacA*, *yacB*, *yacC*, *yagA*, *yubl*, *yubJ*, SLP2\_0039 (que codifican para proteínas hipotéticas), *cib* (codifica para un tipo de bacteriocina), *psiB* y *psiA* (codifican para proteínas que inhiben la inducción de la respuesta SOS del plásmido) *traF* y *traE* (sus proteínas codificadas están implicadas en la conjugación del plásmido). Y un gen estimulado (1 %), el gen *pilU* con actividad endopeptidasa.

Por su parte, el plásmido pSLT presenta 4 genes estimulados (4 %): *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD* involucrados en la patogenicidad de *Salmonella* durante el proceso de invasión de células epiteliales. Las proteínas SpvB y SpvC son translocadas dentro de la célula hospedadora por el T3SS-2. SpvC previene la polimerización de la actina por medio de la ADP ribosilación de los monómeros de actina, mientras SpvC tiene actividad fosfotreonina liasa que inhibe la señalización de las MAP quinasas (MAPK), proteínas reguladoras de la transcripción de la célula eucariota (Guiney & Fierer, 2011). Curiosamente el gen *spvR* del mismo locus, que codifica para un regulador de la familia Lys de activadores transcripcionales, no se encuentra afectado por los factores Gre. El plásmido pSLT también presenta 2 genes reprimidos (2 %) que son *parA* y *parB* que codifican para proteínas involucradas en la distribución del plásmido a las células hijas durante la división celular.

**Bacteriófagos:**

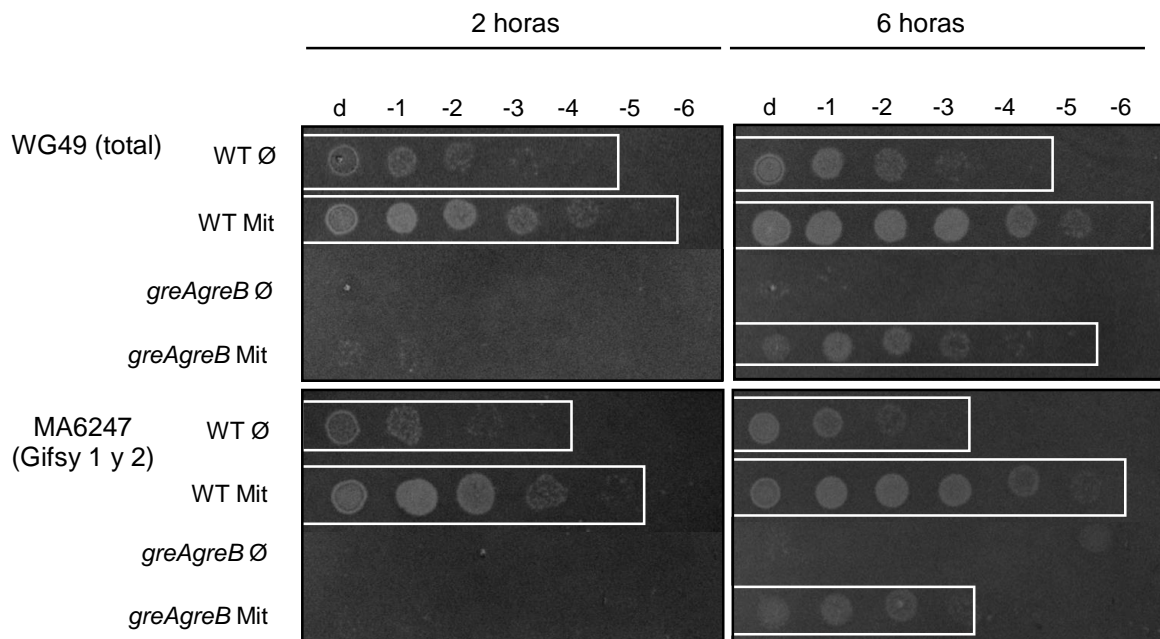
Se ha descrito que la cepa SV5015 de *Salmonella* contiene 6 bacteriófagos activos: Gifsy 1 y 2 ( $\lambda$ -phage like), SopE $\Phi$  (Fels-2), Fels-1 (P4-like), SLP203

(P22-like), y un profago remanente inactivo (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Los resultados transcriptómicos mostraron que los factores Gre afectan la expresión de genes de los fagos presentes en *Salmonella* (figura 4.46) tal y como se especifica a continuación:

- Gifsy 1: Los factores Gre estimulan 19 genes y no reprimen ninguno de los 54 genes codificados en este fago.
- Gifsy 2: Los factores Gre estimulan 7 y no reprimen ninguno de los 55 genes codificados en este fago.
- Fels-1: De los 13 genes que codifica este fago, ninguno se encuentra estimulado por los factores Gre, pero se encuentran reprimidos 5 genes.
- SopE $\Phi$  (Fels-2): Los factores Gre estimulan 3 y reprimen un gen de los 45 genes codificados en este fago.
- Profago remanente inactivo: Los factores Gre estimulan 2 genes y reprimen uno de los 27 genes codificados en este fago.
- SLP203 (14 %): Los factores Gre estimulan 7 genes y reprimen 2 de los 27 genes codificados en este fago.

Para determinar si, en concordancia con los datos obtenidos en el análisis transcriptómico, los factores Gre afectan la biología de los fagos de *Salmonella*, se estudió la capacidad de la cepa mutante *greAgreB* de producir bacteriófagos en condiciones de inducción y no inducción del ciclo lítico vírico, mediante la adición del inductor mitomicina C. La mitomicina C es un agente que induce daño en el ADN, desencadenando la respuesta SOS y consecuentemente la inducción del ciclo lítico del fago (Mirolid *et al.*, 1999). La cepa WT (SV5015) y su derivada *greAgreB* (TGC-3) fueron crecidas en LB a 37 °C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,1. Los cultivos fueron divididos en dos, uno de ellos fue inducido por adición de 50 µg/ml de mitomicina C. Se continuó la incubación de ambos y se cogieron muestras para determinar las partículas víricas a las 2 y 6 horas post-adición de mitomicina C. Las partículas fágicas fueron detectadas por titulación usando dos cepas indicadoras: la cepa WG49, utilizada para detectar colifagos de ARN f-específicos (Dra. Muniesa), y la cepa MA6247, utilizada para detectar los

bacteriófagos Gifsy 1 y 2 (Rhodes & Kator, 1991) (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). La figura 4.47 muestra resultados equivalentes en ambas cepas indicadoras.



**Figura 4.47.** Efecto de los factores Gre en la producción de partículas víricas en *Salmonella*. Cultivos de las cepas WT y mutante *greAgreB* fueron crecidos en LB a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,1. La respuesta SOS fue inducida por adición de 50 µg/ml de mitomicina C (Mit). Se analizaron muestras tras 2 y 6 horas. Como control, se utilizaron cultivos sin añadir Mit (Ø). El sobrenadante conteniendo los fagos liberados, fueron diluidos y sembrados en agar blando conteniendo las cepas indicadoras, WG49 o MA6247, a 37 °C durante 18 horas.

La cepa WT produce bacteriófagos durante el crecimiento en LB a 37 °C en ausencia de mitomicina C, y la cantidad de fagos producidos aumenta significativamente con la inducción de la respuesta SOS por la adición de mitomicina C. Las partículas fágicas se detectan a las 2 horas y no se observa un incremento significativo al alargar 4 horas más el cultivo bacteriano. En ausencia de los factores Gre, no hay producción de fagos en ausencia de mitomicina C. En presencia de mitomicina C tampoco se detectan calvas a las 2 h, si bien si se detecta presencia de partículas víricas a las 6 h de exposición a la mitomicina C. Indicando claramente que la mutación en los factores Gre causa una incapacidad para replicar apropiadamente los fagos en ausencia de inducción del ciclo lítico y causa un importante retraso en la producción de partículas víricas incluso en condiciones de inducción. Estos resultados



corroboran un posible papel de los factores Gre en la expresión de genes de bacteriófagos presentes en *Salmonella*.

### **4.4.3 Genes corregulados por los factores Gre y la proteína DksA en *Salmonella***

Los factores Gre interaccionan con el canal secundario de la ARN polimerasa. Este canal es también el lugar de interacción de otros factores reguladores como el nucleótido ppGpp y la proteína DksA, mediadores de la respuesta estricta. De hecho, existe una importante similitud estructural entre los factores Gre y la proteína DksA. También se han descrito otras proteínas que podrían interaccionar con el mismo dominio de la ARNpol, como RnK y TraR. La presencia de diferentes proteínas con capacidad de interaccionar en el mismo dominio de la ARNpol sugiere una posible competencia por la unión. En *E. coli* se ha sugerido que esta competencia por el canal secundario puede tener un impacto en el patrón de expresión génica (Stepanova *et al.*, 2007) (Aberg *et al.*, 2008). De modo que el hecho de eliminar una de estas proteínas en la célula, modificaría la competencia por el canal secundario, pudiendo favorecer la interacción con otra proteína causando consecuentemente una alteración en el patrón de expresión génica. Así, en *E. coli* se ha visto que el efecto de la mutación *dksA* en ciertos genes puede deberse a que en ausencia de la proteína DksA se ve favorecida la interacción de GreA con la ARNpol (Aberg *et al.*, 2009).

Atendiendo a que en el grupo de investigación se habían realizado ensayos transcriptómicos de forma idéntica a los previamente mostrados pero con una cepa mutante *dksA*, se decidió hacer un análisis comparativo de los genes afectados en la cepa doble mutante *greAgreB* obtenidos en este trabajo, y en la cepa mutante *dksA* con el fin de analizar los genes que se encuentran corregulados por los factores Gre y la proteína DksA en *Salmonella*. Inicialmente se tuvieron en consideración los genes afectados con un FC entre 3 y -3 respecto a la cepa salvaje (tabla S5 material suplementario adjunto en la memoria USB). Como se observa en la tabla 4.8, de todos los genes que componen el genoma de *Salmonella*, la mutación en el gen *dksA* afectó un número de genes (519) en

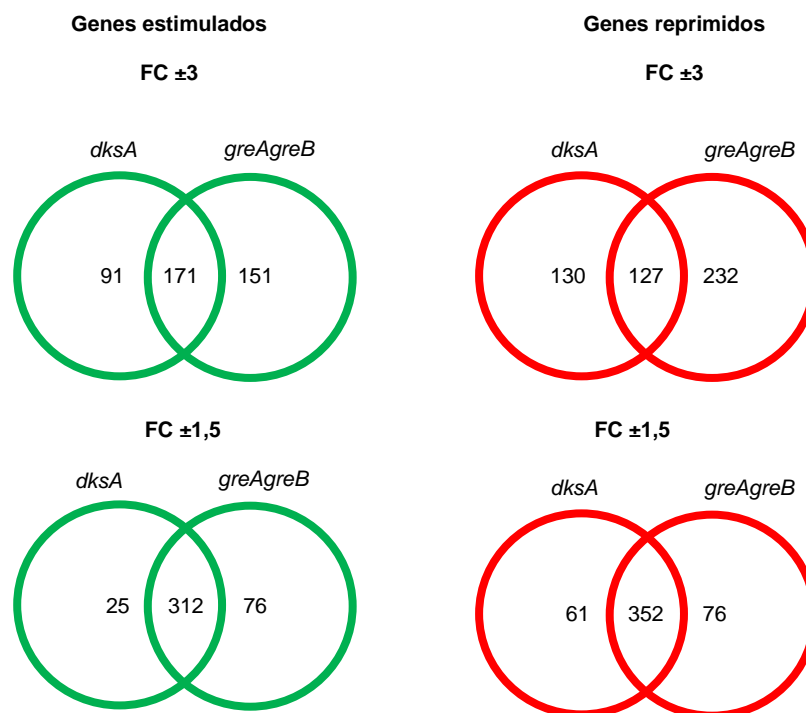
un rango parecido al afectado en la doble mutante *greAgreB* (681). También se observa que del total de genes afectados en cada cepa, aproximadamente la mitad son estimulados y la mitad reprimidos.

**Tabla 4.8.** Total de genes afectados en la cepa doble mutante *greAgreB* y en la mutante *dksA* respecto a la cepa WT. Comparaciones realizadas con un FC entre 3 y -3. Genes “Down”: genes estimulados por los factores Gre o la proteína DksA. Genes “Up”: genes reprimidos por los factores Gre o la proteína DksA. Entre paréntesis se indica el porcentaje respecto al total de genes presentes en el genoma, el *core genome* o HGT, respectivamente.

Mutación		<i>dksA</i>	<i>greAgreB</i>	Total de genes
Global	Down (%)	262 (5,5)	322 (6,8)	4735
	Up (%)	257 (5,4)	359 (7,6)	
	Total (%)	519 (10,9)	681 (14,4)	
<i>Core genome</i>	Down (%)	175 (4,2)	193 (4,7)	4132
	Up (%)	244 (5,9)	335 (8,1)	
	Total (%)	419 (10,1)	528 (12,8)	
HGT	Down (%)	87 (14,4)	129 (21,4)	603
	Up (%)	13 (2,2)	24 (4)	
	Total (%)	100 (16,6)	153 (25,4)	

El análisis detallado de los genes afectados en cada una de las cepas muestra que los factores Gre corregulan junto con la proteína DksA un importante número de genes de *Salmonella* (figura 4.48). De los genes estimulados por los factores Gre, un 53 % (171 de 322) también lo están por DksA. Además de los 151 genes estimulados únicamente por los factores Gre con un FC  $\pm 3$ , 75 genes también están estimulados por DksA considerando un FC de  $\pm 1,5$ . Teniendo en cuenta esta correlación, se puede considerar que hasta el 76 % (171+75 de 322) de los genes estimulados por los factores Gre también son estimulados por DksA. De la misma manera, de los genes estimulados por DksA, un 65 % (171 de 262) también son estimulados por los factores Gre. De los 91 genes estimulados únicamente por DksA con un FC  $\pm 3$ , 66 genes también son estimulados por los factores Gre considerando un FC  $\pm 1,5$ . De modo que hasta el 90 % (171+66 de 262) de los genes estimulados por DksA también son estimulados por los factores Gre.

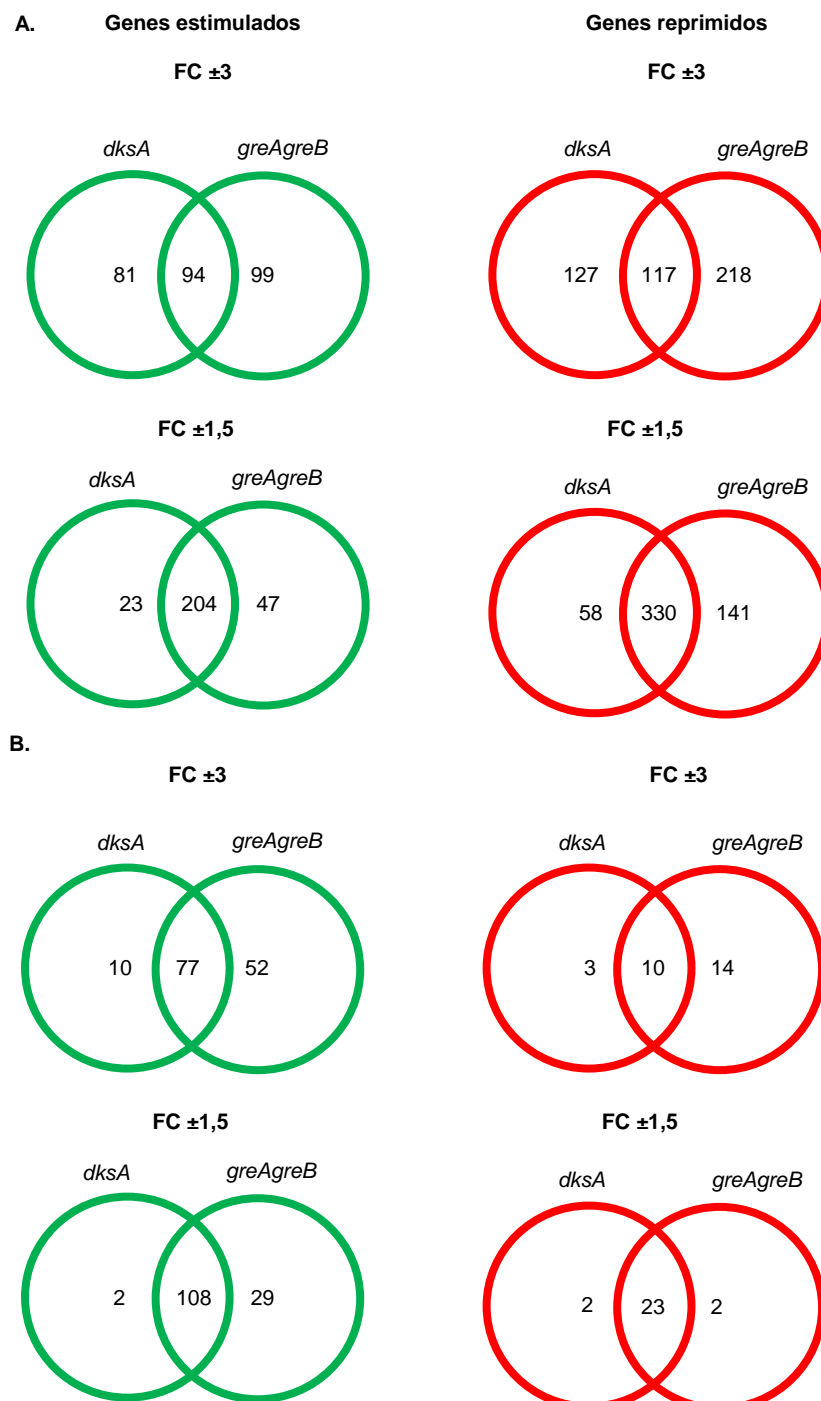
Al aplicar el mismo tipo de cálculos para los genes reprimidos por los factores Gre y DksA. De los genes reprimidos por los factores Gre, un 35,4 % (127 de 359) también lo están por DksA. Este porcentaje se eleva al 79 % teniendo en cuenta los genes reprimidos por DksA considerando un FC de  $\pm 1,5$ . De la misma manera, de los genes reprimidos por DksA, un 49,4 % (127 de 257) también son reprimidos por los factores Gre y este porcentaje incrementa hasta el 76 %.



**Figura 4.48.** Genes corregulados por los factores Gre y la proteína DksA en *Salmonella*. Comparaciones realizadas con un FC de  $\pm 3$  y  $\pm 1,5$ .

De forma similar a lo mostrado en anteriores apartados, los genes fueron diferenciados entre *core genome* y HGT en la cepa mutante *dksA* y la cepa doble mutante *greAgreB* respecto a la cepa WT, con un FC de  $\pm 3$  (tabla 4.8). El número de genes afectados del *core genome* en las cepas *dksA* y *greAgreB* es similar (419 y 528, respectivamente). Es destacable que en ambos casos el número de genes estimulados por los factores Gre (193) y DksA (175) es claramente inferior al número de genes reprimidos (factores Gre, 335 y DksA, 244). Esto indica que tanto los factores Gre como la proteína DksA, estarían ejerciendo un efecto mayoritariamente represor entre los genes del *core genome*. Al realizar un

diagrama de Venn similar a los realizados anteriormente, se observa que para los genes del *core genome* el comportamiento es similar al descrito para la totalidad del genoma. Detectándose un número elevado de genes cuya expresión está afectada tanto por la falta de los factores Gre como de la proteína DksA (figura 4.49).



**Figura 4.49.** Genes del *core genome* (A) y HGT (B) coregulados por los factores Gre y la proteína DksA. Comparaciones realizadas con un FC de  $\pm 3$  y  $\pm 1,5$ .

En el caso de los genes HGT, se encuentran más genes afectados en la mutación en los factores Gre (153) que en la mutación *dksA* (100). Los factores Gre estimulan 129 genes, mientras que DksA estimula 87 genes, con un FC de  $\pm 3$ . Interesantemente, en los genes HGT también se observa que el número de genes afectados únicamente por DksA es muy bajo, al igual que los genes reprimidos que están solamente afectados en *greAgreB* (2 de 25 genes en HGT frente a los 141 de 471 en el *core genome*).

Los resultados de este apartado demuestran que existe una corregulación muy extendida por parte de los factores Gre y la proteína DksA en el genoma de *S. Typhimurium*, resultados que se resumen en la figura 4.50.

**FC:  $-1,5 < \emptyset > 1,5$**

GreAgreB	DksA	Número de genes	Tipo de regulación
		312 (34,6 %)	Similares
		352 (39,1 %)	
	$\emptyset$	72 (8 %)	Independientes
	$\emptyset$	66 (7,3 %)	
$\emptyset$		23 (2,5 %)	
$\emptyset$		46 (5,1 %)	
		18 (2 %)	Opuestos
		11 (1,2 %)	

**Figura 4.50.** Cantidad de genes afectados de manera similar, independiente y opuesta entre las mutantes *greAgreB* y *dksA*. El sombreado verde corresponde a los genes estimulados y el rojo a los genes reprimidos por los factores Gre y/o DksA. Entre paréntesis se indica el porcentaje de

genes respecto al total de genes afectados (900). El FC utilizado de  $\pm 1,5$  hace referencia a los genes con expresión diferencial respecto al FC  $\pm 3$  de los factores Gre versus DksA, o viceversa.

De los genes afectados, hay un mayor número de genes corregulados por los factores Gre y DksA (tabla S5 material suplementario adjunto en la memoria USB), ya sean estimulados o reprimidos por ambos factores Gre y la proteína DksA (664), en comparación con los regulados de manera aparentemente independiente (207) (tablas 4.9 y 4.10) y/o antagónica (29) (tabla 4.11). En *E. coli* se ha visto que una deleción en el gen *dksA* puede ser complementada por la sobreexpresión de la proteína GreA indicando una posible similitud funcional de ambas proteínas. Esta reiteración funcional de estos factores podría justificar el hecho de que haya un elevado número de genes corregulados.

Los genes regulados por los factores Gre independientemente de la proteína DksA se encuentran en la tabla 4.9 y los genes regulados por la proteína DksA independientemente de los factores Gre se encuentran en la tabla 4.10. Como se observa, estos genes se encuentran distribuidos en diferentes categorías funcionales como transporte y unión de proteínas, metabolismo energético, envuelta celular, procesos celulares y síntesis de proteínas, entre otras. Cabe resaltar que en los genes estimulados únicamente por los factores Gre se encuentran bastantes genes pertenecientes a HGT como los codificados en el fago Gifsy-1. Y en el caso de los genes afectados únicamente por DksA la mayoría están involucrados en procesos metabólicos.

También se encontraron genes cuya expresión es regulada de manera antagónica por los factores Gre y la proteína DksA. En la tabla 4.11 se muestran estos genes y la categoría funcional a la cual pertenecen. Interesantemente estos genes están distribuidos en diferentes categorías funcionales principalmente en el metabolismo energético. El gen *orfX* de la SPI-5 sin función caracterizada, es el único gen HGT que se encuentra regulado de manera opuesta por los factores Gre y la proteína DksA con un FC de  $\pm 3$ .

En conjunto, estos resultados posiblemente indican que el patrón general de expresión génica de *Salmonella* es el resultado de una compleja interacción entre los factores Gre y la proteína DksA, que implica el control mutuo, competición por la unión a la ARNpol, y la acción similar u opuesta sobre la actividad de la ARNpol.

**Tabla 4.9.** Genes afectados únicamente en la cepa mutante *greAgreB*. En verde se indican los genes estimulados y en rojo los genes reprimidos por los factores Gre con un FC de  $\pm 3$

Categoría funcional*	ID	gene	dksA vs WT	greAgreB vs WT	Categoría funcional*	ID	gene	dksA vs WT	greAgreB vs WT
<i>cob/pdu</i>	SL2014	<i>pduA</i>	-1,26	-22,81	BA	SL4471	<i>frlB</i>	1,19	14,58
PC	SL2755	<i>fljA</i>	-1,47	-15,85	TUP	SL2407	<i>cysP</i>	1,12	13,02
pSLT	SLP1_0068	<i>vsdC</i>	1,35	-12,28	TUP	SL2404	<i>cysA</i>	-1,07	12,67
Gifsy-1	SL2569	<i>sppA</i>	-1,10	-10,71	FD	SL2773	<i>csiD</i>	1,04	11,87
	SL2573	<i>nohA</i>	-1,00	-8,60	MIC	SL2913	<i>cysN</i>	1,02	11,16
PC	SL3126	<i>tse</i>	-1,18	-8,28	FD	SL2774	<i>ygaF</i>	-1,02	9,95
SP	SL3125	<i>yghW</i>	-1,23	-6,35	MA	SL2912	<i>cysC</i>	-1,13	9,51
pSLT	SLP1_0067	<i>spvA</i>	1,16	-6,22	TUP	SL2406	<i>cysU</i>	-1,10	8,74
Gifsy-1	SL2570	-	1,01	-6,06	TUP	SL4351	<i>xyIE</i>	1,22	7,99
FD	SL1762	<i>yobD</i>	-1,41	-5,91	EC	SL2896	<i>ygbK</i>	-1,12	7,13
SP	SL0681	-	-1,24	-5,70	SP	SL1730	<i>dadX</i>	1,36	6,94
Gifsy-1	SL2575	<i>rzpD</i>	-1,01	-5,68	TUP	SL1066	<i>sglT</i>	-1,01	6,36
TUP	SL2184	<i>setB</i>	-1,31	-5,41	MIC	SL2897	<i>ygbJ</i>	1,01	6,18
FD	SL3576	<i>yhjH</i>	1,16	-5,37	TUP	SL2405	<i>cysW</i>	-1,26	6,01
NC	SL2758	-	-1,34	-5,31	ME	SL2895	<i>ygbL</i>	-1,08	5,99
Gifsy-1	SL2550	<i>ycdD</i>	-1,49	-4,98	EC	SL1069	<i>yiiY</i>	1,10	5,40
	SL2567	-	-1,34	-4,91	TUP	SL0512	<i>glxR</i>	1,44	5,13
FD	SL3544	<i>yhhQ</i>	-1,17	-4,91	TUP	SL0513	<i>yybO</i>	1,01	4,88
PI	SL4131	-	-1,33	-4,83	MIC	SL2914	<i>cysD</i>	-1,47	4,76
Gifsy-1	SL2572	<i>tfaD</i>	1,39	-4,71	ME	SL1400	<i>fumC</i>	1,45	4,75
TUP	SL4231	<i>adiC</i>	1,36	-4,64	MAGF	SL2357	<i>fadJ</i>	1,43	4,65
	SL0682	<i>potE</i>	-1,11	-4,57	EC	SL2893	<i>rffG</i>	1,08	4,43
Gifsy-1	SL2568	-	-1,25	-4,48	ME	SL1283	<i>ppsA</i>	-1,07	4,30
MIC	SL0683	<i>speF</i>	1,21	-4,29	MIC	SL2894	<i>ygbM</i>	-1,33	4,27
TR	SL0796	<i>rhIE</i>	-1,21	-4,28	NC	SL1291	<i>ydiF</i>	1,13	4,23
Gifsy-2	SL0967	<i>rzpD</i>	-1,16	-4,10		SL1303	<i>sufA</i>	1,12	4,08
Gifsy-1	SL2555	-	-1,38	-3,95	FD	SL1068	<i>nanM</i>	1,16	4,04
PC	SL3189	<i>tse</i>	-1,05	-3,94	BA	SL0111	<i>leuC1</i>	1,11	3,98
EC	SL2191	<i>spr</i>	-1,01	-3,81	pCol1B	SLP2_0078	-	1,11	3,93
Gifsy-1	SL2566	-	-1,25	-3,76	TUP	SL0854	<i>potF</i>	-1,24	3,91
HP	SL1679	<i>ycheE</i>	1,13	-3,72	TUP	SL0515	<i>ybbW</i>	1,49	3,89
NC	SL1473	-	-1,35	-3,72	ME	SL0159	<i>acnB</i>	1,23	3,83
SLP203	SL1951	-	1,03	-3,72	TUP	SL2892	<i>ygbN</i>	-1,02	3,82
TUP	SL3814	<i>mdtL</i>	-1,22	-3,71	RG	SL0672	<i>citB</i>	1,07	3,82
SP	SL3514	-	-1,47	-3,60	TUP	SL1046	<i>ttuB</i>	1,35	3,69
PYT	SL1804	-	1,20	-3,58		SL0805	<i>glnH</i>	1,24	3,68
FD	SL3176	<i>ygiM</i>	-1,46	-3,56	MA	SL1467	<i>hupB</i>	1,16	3,66
RG	SL0613	<i>dpiB</i>	-1,36	-3,56	ME	SL3759	<i>rbsK</i>	1,43	3,60
Gifsy-1	SL2576	<i>arrD</i>	1,01	-3,56	MA	SL1401	<i>tus</i>	1,34	3,56
SLP203	SL1957	-	1,15	-3,53	PPNN	SL4020	-	1,41	3,55



## Resultados

Categoría funcional*	ID	gene	dkSA vs WT	greAgreB vs WT	Categoría funcional*	ID	gene	dkSA vs WT	greAgreB vs WT
Gifsy-2	SL0989	<i>ycdD</i>	-1,34	-3,53	ME	SL0720	<i>sucC</i>	1,40	3,54
	SL0966	<i>arrD</i>	1,02	-3,53	TUP	SL1677	<i>oppA</i>	1,43	3,54
Fels-2	SL2704	-	1,29	-3,46	SP	SL3757	-	1,17	3,49
SLP203	SL1955	<i>rzpD</i>	1,03	-3,37	TUP	SL3522	<i>ugpA</i>	1,19	3,48
	SL1956	-	1,24	-3,36	TUP	SL1472	<i>exuT</i>	1,38	3,48
BA	SL4055	<i>metF</i>	1,08	-3,35	PF	SL0266	<i>clpB</i>	1,30	3,43
FD	SL1204	<i>aroQ</i>	-1,13	-3,35	BA	SL2050	<i>hisC</i>	-1,08	3,41
Gifsy-1	SL2552	<i>stfQ</i>	-1,38	-3,35	TUP	SL3758	<i>fucP</i>	1,27	3,39
SLP203	SL1950	<i>ymfN</i>	1,02	-3,34	EC	SL3167	<i>dsbB</i>	1,04	3,38
NC	SL1182	<i>cspH</i>	-1,12	-3,33	TUP	SL4412	<i>idnT</i>	1,46	3,38
EC	SL2467	-	-1,21	-3,33	BA	SL3165	-	1,45	3,35
SP	SL1844	<i>argS</i>	1,29	-3,31	TUP	SL2243	<i>ttuB</i>	1,01	3,31
ME	SL3670	<i>gpml</i>	-1,28	-3,23	ME	SL0764	<i>hutI</i>	1,31	3,21
PPNN	SL2472	<i>guaB</i>	-1,30	-3,20	RG	SL0551	<i>ykgD</i>	-1,11	3,20
EC	SL2468	<i>yfgG</i>	-1,21	-3,19	ME	SL3794	<i>dgoD1</i>	-1,03	3,20
	SL1860	<i>flhD</i>	-1,05	-3,17	ME	SL1044	<i>hpcG</i>	1,38	3,18
TUP	SL3472	<i>feoA</i>	-1,31	-3,17	TUP	SL3521	<i>ugpE</i>	1,31	3,15
Gifsy-2	SL0968	-	-1,48	-3,14	TUP	SL4012	<i>sbp</i>	1,01	3,15
PC	SL1890	<i>fliS</i>	1,03	-3,14	NC	SL3145	<i>ygiK</i>	1,15	3,14
BCP	SL1859	<i>flhC</i>	-1,47	-3,09	ME	SL3800	<i>dgoD</i>	1,33	3,13
TUP	SL3906	<i>corA</i>	-1,38	-3,08	BA	SL0112	<i>leuB</i>	-1,13	3,10
SLP203	SL1952	-	1,25	-3,08	MAGF	SL2408	<i>ucpA</i>	-1,10	3,08
FD	SL1262	<i>ydiY</i>	-1,20	-3,05	PF	SL3166	<i>dsbA</i>	1,18	3,06
pCol1B	SLP2_0086	-	1,25	-3,05	TUP	SL3541	<i>zntA</i>	-1,05	3,05
FD	SL0044	<i>rpsT</i>	1,12	-3,04	PRSF1010	SLP3_0011	<i>mobC</i>	1,44	3,03
SP	SL3275	<i>rpmA</i>	1,01	-3,03	ME	SL1045	<i>hpcH</i>	1,31	3,02
PC	SL1891	<i>fliT</i>	1,06	-3,00					
Gifsy-1	SL2564	-	-1,14	-3,00					
PC	SL1857	<i>motB</i>	-1,45	-2,99					
NC	SL1318	-	-1,45	-2,98					

**\*Categoría funcional:**

PC: Procesos celulares, SP: Síntesis de proteínas, FD: Función desconocida, TUP: Transporte y unión de proteínas, NC: No clasificado

BA: Biosíntesis de aminoácidos, MIC: Metabolismo intermediario central, MA: Metabolismo del ADN, EC: Envuelta celular

PRI: Profago remanente inactivo, ME: Metabolismo energético, MAGF: Metabolismo de ácidos grasos y lípidos, TR: Transcripción

HP: Hipotética, PYT: Profagos y transposones, RG: Regulación, PPNN: Purinas, pirimidias, nucleótidos y nucleósidos, PF: *Protein fate*

BCP: Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos

**Tabla 4.10.** Genes afectados únicamente en la cepa mutante *dksA*. En verde se indican los genes estimulados y en rojo los genes reprimidos por la proteína DksA FC de  $\pm 3$

Categoría funcional*	ID	gene	<i>dksA</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT	Categoría funcional*	ID	gene	<i>dksA</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
TUP	SL3595	<i>dppB</i>	-7,97	-1,12	SPI-5	SL1032	-	7,87	-1,49
	SL3594	<i>dppC</i>	-6,99	-1,14	FD	SL3304	<i>yhcG</i>	6,91	1,35
ME	SL1250	<i>chbR</i>	-5,19	-1,16	EC	SL1124	<i>yiaF</i>	6,82	-1,14
BA	SL2991	<i>lysA</i>	-4,95	-1,32	SP	SL1439	<i>ydfZ</i>	6,74	1,39
TUP	SL3593	<i>dppD</i>	-4,77	1,11	ME	SL2230	<i>napD</i>	5,81	-1,16
	SL4069	<i>ppc</i>	-4,32	-1,26	NC	SL1596	-	5,27	-1,06
ME	SL3029	<i>gcvP</i>	-4,23	1,01	TUP	SL0607	<i>citG2</i>	5,25	-1,25
BA	SL3262	<i>argG</i>	-4,12	1,18		SL2379	<i>yfeC</i>	5,24	1,46
PF	SL3592	<i>dppF</i>	-3,99	1,31	FD	SL4383	-	5,18	-1,04
EC	SL3540	<i>yhhN</i>	-3,96	-1,05		SL3134	<i>b3007</i>	4,98	1,27
SPI-2	SL1348	<i>ssaV</i>	-3,7	-1,41	PPNN	SL4390	<i>pyrI</i>	4,61	1,05
PF	SL0446	<i>ppiD</i>	-3,61	-1,27	TR	SL1810	<i>holE</i>	4,58	-1,04
FD	SL1444	<i>ydeJ</i>	-3,51	-1,03	ME	SL2231	<i>napF</i>	4,56	1,09
pSLT	SLP1_0031	<i>traL</i>	-3,38	-1,36	EC	SL0790	<i>ybhQ</i>	4,45	1,17
	SL0881	<i>macB</i>	-3,32	-1,49	TUP	SL4164	<i>malF</i>	4,45	1,14
TUP	SL2362	<i>yfdC</i>	-3,14	1,4	ME	SL0396	<i>malZ</i>	4,43	-1,05
SP	SL0937	<i>asnS</i>	-3,14	-1,25	BCP	SL0183	<i>panB</i>	4,25	-1,33
	SL3053	<i>yggG</i>	-3,11	-1,48	SP	SL2188	<i>yeiP</i>	4,21	-1,18
FD	SL1798	<i>insF1</i>	-3,08	-1,34	ME	SL1501	<i>fdnG</i>	4,12	1,12
TUP	SL2794	<i>proV</i>	-3,01	-1,46	TUP	SL3753	<i>uhpT</i>	3,98	1,42
ME	SL1251	<i>chbF</i>	-2,98	1,23	FD	SL1492	<i>hdeB</i>	3,96	-1,2
BA	SL4071	<i>argC</i>	-2,98	1,02	TUP	SL3713	<i>xanP</i>	3,94	1,11
FD	SL0593	<i>ybdN</i>	-2,98	-1,24	ME	SL1498	<i>fdnI</i>	3,85	-1,34
PPNN	SL4391	<i>pyrB</i>	3,84	-1,15	SP	SL4053	-	3,84	1,48
RG	SL2728	-	3,68	1,38	RG	SL4397	<i>arcA</i>	3,4	1,41
SP	SL3660	<i>yibK</i>	3,68	-1,22	TUP	SL3042	<i>argO</i>	3,4	-1,49
PF	SL2978	<i>ppdA</i>	3,67	1,23	MA	SL2757	NA	3,3	-1,06
FD	SL2940	<i>garK</i>	3,66	1,41	FD	SL3752	<i>yicN</i>	3,22	1,11
ME	SL4214	<i>nrfB</i>	3,64	-1,02	ME	SL0556	<i>pheP</i>	3,17	-1,29
MIC	SL2251	<i>glpQ</i>	3,61	-1,04	BCP	SL0632	<i>cobD</i>	3,16	1,02
PPNN	SL3306	<i>codA</i>	3,61	-1,13	MIC	SL1020	<i>rlmI</i>	3,16	-1,01
ME	SL1500	<i>fdnG</i>	3,6	-1,19	FD	SL1627	<i>ydiV</i>	3,11	1,44
MAGF	SL0074	<i>caiA</i>	3,58	1,33	EC	SL3690	<i>waaA</i>	3,06	-1,2
MA	SL3614	<i>yiaG</i>	3,52	1,04	EC	SL3871	-	3,48	1,45
ME	SL1499	<i>fdnH</i>	3,5	-1,09					

**\*Categoría funcional:**

PC: Procesos celulares, SP: Síntesis de proteínas, FD: Función desconocida, TUP: Transporte y unión de proteínas, NC: No clasificado

BA: Biosíntesis de aminoácidos, MIC: Metabolismo intermediario central, MA: Metabolismo del ADN, EC: Envuelta celular

PRI: Profago remanente inactivo, ME: Metabolismo energético, MAGF: Metabolismo de ácidos grasos y lípidos, TR: Transcripción

HP: Hipotética, PYT: Profagos y transposones, RG: Regulación, PPNN: Purinas, pirimidias, nucleótidos y nucleósidos, PF: *Protein fate*

BCP: Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos

## Resultados

**Tabla 4.11.** Genes regulados de manera antagónica por los factores Gre y la proteína DksA. En verde se indican los genes estimulados y en rojo los genes reprimidos

Categoría funcional*	ID	gene	greAgreB vs WT	dksA vs WT
ME	SL3442	<i>nirD</i>	-6,95	3,43
TUP	SL2522	<i>yjdL</i>	-6,76	2,24
	SL3443	<i>nirC</i>	-5,91	2,27
ME	SL2521	<i>cadA</i>	-4,98	1,93
HP	SL3301	<i>yhcC</i>	-3,69	2,46
	SL3441	<i>nirB</i>	-3,09	4,39
	SL0610	<i>citE</i>	-2,50	21,38
ME	SL0612	<i>citC</i>	-2,47	8,29
	SL0611	<i>citD1</i>	-2,36	22,22
	SL3216	<i>tdcB</i>	-2,06	4,61
	SL1434	<i>ynfA</i>	-1,97	3,16
FD	SL0606	<i>citT</i>	-1,87	4,10
	SL0608	<i>citX</i>	-1,87	18,14
NC	SL3305	<i>codB</i>	-1,80	3,48
SPI-5	SL1031	<i>orfX</i>	-1,75	9,42
FD	SL1739	<i>ycgN</i>	-1,74	3,15
ME	SL0609	<i>citF</i>	-1,61	21,53
FD	SL4392	<i>pyrL</i>	-1,50	3,07
EC	SL1077	<i>csgF</i>	2,00	-3,23
RG	SL0363	<i>prpB</i>	2,74	-3,95
BA	SL2049	<i>hisD</i>	3,14	-1,50
PF	SL3596	<i>dppA</i>	3,36	-2,14
EC	SL0196	<i>smfA</i>	3,38	-1,80
	SL2927	<i>cysJ</i>	4,34	-2,43
ME	SL0366	<i>prpE</i>	4,91	-1,92
	SL0364	<i>prpC</i>	5,33	-2,42
MIC	SL2925	<i>cysH</i>	5,34	-1,73
NC	SL2926	<i>cysI</i>	6,16	-2,06
FD	SL0365	<i>prpD</i>	6,64	-1,50

**\*Categoría funcional:**

PC: Procesos celulares, SP: Síntesis de proteínas, FD: Función desconocida, TUP: Transporte y unión de proteínas, NC: No clasificado

BA: Biosíntesis de aminoácidos, MIC: Metabolismo intermediario central, MA: Metabolismo del ADN, EC: Envuelta celular

PRI: Profago remanente inactivo, ME: Metabolismo energético, MAGF: Metabolismo de ácidos grasos y lípidos, TR: Transcripción

HP: Hipotética, PYT: Profagos y transposones, RG: Regulación, PPNN: Purinas, pirimidias, nucleótidos y nucleósidos, PF: *Protein fate*

BCP: Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos

## 5. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

En *E. coli*, se ha descrito que los factores Gre podrían intervenir en la regulación de la expresión génica y en la fisiología de la célula a través de diferentes mecanismos. Dos de ellos actúan a nivel transcripcional y un tercero a nivel post-transcripcional. Tras interactuar con el canal secundario de la ARNpol, los factores Gre podrían actuar a diferentes niveles: 1) facilitando el escape de la ARNpol del promotor durante el inicio de la transcripción, reduciendo la transcripción abortiva, 2) suprimiendo el estado de pausa en el que la ARNpol puede entrar durante la elongación del transcrito, al inducir la actividad endorribonucleotídica de la ARNpol. Se ha de resaltar que ambos mecanismos causan una estimulación de la transcripción, por lo que los factores Gre actuarían como activadores de la transcripción. Como tercer mecanismo propuesto, a nivel post-transcripcional, GreA actuaría como chaperona, proporcionando estabilidad estructural a ciertas proteínas (Laptenko *et al.*, 2003) (Li *et al.*, 2012). Existen datos que enfatizan la importancia biológica de los factores Gre. Los genes que codifican para estas proteínas y proteínas homólogas han sido encontrados en genomas de la mayoría de bacterias. En el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, organismo con uno de los genomas más pequeños, *greA* está entre los 200 genes esenciales para la viabilidad de la bacteria (Hutchison *et al.*, 1999). En otras bacterias, la delección de *greA* conlleva a una hipersensibilidad hacia agresiones ambientales, tales como la presencia de detergentes iónicos, temperaturas elevadas, y choque osmótico (Campbell *et al.*, 2003) (Nogales *et al.*, 2002) (Orlova *et al.*, 1995). Los genes *greA* de *E. coli* y *Salmonella* han sido descritos como miembros de los genes regulados por  $\sigma^E$ , lo que resalta aún más el papel potencial de GreA en respuesta al estrés celular. El factor sigma E alternativo ( $\sigma^E$ ) responde a diferentes señales extracitoplasmáticas como la temperatura, la presión osmótica y el estrés oxidativo. En *Salmonella*, una delección del  $\sigma^E$  es letal para la supervivencia dentro de macrófagos. (Rhodius *et al.*, 2006) (Yoon *et al.*, 2009) (Li *et al.*, 2015). Estas observaciones hacen pensar que los factores Gre puedan estar especialmente implicados en promover la resistencia de los microorganismos a ambientes hoscas. La relación exacta entre

las funciones bioquímicas de los factores Gre y su papel en la fisiología de la célula aún no ha sido establecida.

Atendiendo a las funciones descritas para los factores Gre, como factores que promueven la elongación de la transcripción y el inicio de la transcripción al disminuir la transcripción abortiva, es fácil atribuirles un papel estimulador de la expresión génica. No obstante, tanto trabajos previos en *E. coli* (Stepanova *et al.*, 2007) como los datos en *Salmonella*, mostrados en esta memoria, atribuyen una importante función represora a GreA. Este efecto represor por parte de los factores Gre puede ser atribuido a un efecto indirecto. Los factores Gre podrían afectar la expresión de factores adicionales (represores) responsables de la represión de un número más o menos elevado de genes. De esta manera al reprimir la expresión de un represor estaríamos causando la activación de diversos genes. El hecho de que una parte importante del efecto de los factores Gre sea indirecto es también extensible a los genes activados, el control de la expresión de una proteína activadora por parte de los factores Gre tendría un importante impacto en el patrón de expresión génica. En este trabajo mostramos cómo los factores Gre ejercen un control sobre la expresión de genes claves en el control de ciertos procesos celulares como *hilD* y *csgD*, responsables de las cascadas de regulación de la patogénesis y la formación de biofilm, respectivamente.

En *Salmonella*, al igual que en *E. coli*, los genes *greA* y *greB* son considerados operones monocistrónicos. Los datos obtenidos en este estudio demostraron que *greA* de *Salmonella* se encuentra autorregulado negativamente en presencia de la proteína GreA, mientras que la expresión de *greB* no se encuentra autorregulada, resultados que están en correlación con lo descrito previamente para *E. coli* (Vinella *et al.*, 2012) (Fernández-Coll, 2015). Los análisis *in silico* confirman la presencia de estructuras conservadas en las secuencias promotoras, las secuencias correspondientes a las cajas -10 y -35 de los promotores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^E$  descritos en *E. coli* también se encuentran en *Salmonella*. Al hacer la comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas GreA y GreB de ambas especies, claramente indican que hay una elevada

conservación de secuencia y, presumiblemente, de estructura entre las proteínas de ambas especies. Además en este trabajo demostramos que también existe una clara conservación funcional ya que la proteína GreA de *E. coli* es capaz de complementar la mutación del gen *greA* de *Salmonella*. Al igual de lo que ocurre en *E. coli*, los factores Gre de *S. Typhimurium* presentan funcionalidad redundante entre sí, pues tanto en los análisis fenotípicos como en el estudio del análisis global de expresión génica, la eliminación de uno de los factores mostró una afectación poco significativa al compararlo con el efecto causado por la eliminación de ambos factores Gre. Estos resultados sugieren que la función de una proteína Gre puede sustituir, al menos parcialmente, la función de la otra, haciendo que los mutantes simples mostraran, en la mayoría de los casos, un fenotipo muy parecido al de la cepa salvaje.

Dado que el objetivo principal de esta tesis doctoral fue describir el papel de los factores Gre en la fisiología y patogenicidad de *S. Typhimurium*, los primeros experimentos se enfocaron en analizar fenotipos asociados a ambos aspectos. Entre los fenotipos analizados, encontramos la motilidad, la resistencia al estrés oxidativo y la capacidad de lisar eritrocitos, ésta última evidenciando la capacidad de secretar proteínas efectoras que afectan a las células eucariotas. En los fenotipos mencionados, observamos que en la cepa mutante deficiente de ambos factores Gre existía una clara afectación, indicando que los factores Gre podían ser importantes para la correcta expresión de genes relacionados con los procesos celulares mencionados. Estos resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos fueron confirmados con los resultados de los análisis transcriptómicos. Muchos de los genes implicados en motilidad (como *motA*, *motB*, *flhC*, *fliS*, *fliT* y *fliA*), en estrés oxidativo (como *ahpC* y *soxS*) y en lisis de eritrocitos (como *sipB*, *sipC* y *sipD*) se encontraron estimulados por los factores Gre, en las condiciones experimentales utilizadas. Resulta especialmente interesante, el efecto descrito en la sensibilidad al estrés oxidativo. Éste podría estar evidenciando la supuesta regulación de la expresión de *greA* por el factor  $\sigma^E$ . En *E. coli* se ha mostrado que la expresión de *greA* está controlada por dos promotores, uno dependiente de  $\sigma^{70}$  y otro dependiente de  $\sigma^E$ . En *Salmonella*, se ha detectado la existencia de secuencias -35 y -10 en la región promotora de



*greA* que permiten augurar la existencia de ambos promotores. Recientemente, mediante ensayos de ChiP-seq se han mostrado pruebas de la posible regulación de *greA* por  $\sigma^E$  en *Salmonella* (Li *et al.*, 2015). La subunidad alternativa,  $\sigma^E$ , está relacionada con la adaptación bacteriana a estrés extracitoplasmático, generado por factores tales como la temperatura, la presión osmótica y el estrés oxidativo, y regula un elevado número de genes directa e indirectamente. Estudios donde se han identificado los genes que forman parte del regulón del  $\sigma^E$  de *Salmonella*, han demostrado que en su mayoría codifican para proteínas implicadas en el metabolismo y sistemas de reparación del ADN, proteínas reguladoras, proteasas periplasmáticas y proteínas de membrana. También se encuentran genes que juegan un papel importante en la supervivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos (Skovierova *et al.*, 2006) (Li *et al.*, 2015). Skovierova *et al* (2006) identificaron 34 genes  $\sigma^E$ -dependientes en *Salmonella* SL1344 crecida en LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,24 (fase exponencial). Si bien, nuestro ensayo transcriptómico se realizó en inicio de fase estacionaria, de los 34 genes afectados por  $\sigma^E$  en fase logarítmica 8 estaban afectados con un FC de  $\pm 2$  por los factores Gre. Estos genes afectados por los factores Gre están implicados en invasión, respuesta a choque térmico y transporte de proteínas a través del periplasma. Los resultados obtenidos estarían acorde con un modelo en el que GreA juega un papel relevante en el regulón de  $\sigma^E$ . El posible control transcripcional del gen *greA* por  $\sigma^E$  causaría una alteración en los niveles de expresión de diferentes genes Gre-dependientes.

La determinación del patrón general de expresión génica mediante análisis transcriptómico de las cepas mutantes para *greA* y/o *greB* han proporcionado interesantes datos sobre el papel que cumplen las correspondientes proteínas en el control de la expresión génica. Un primer dato, fue el elevado número de genes cuya expresión se veía afectada en la cepa *greA greB* respecto a la cepa salvaje con un FC de  $\pm 2$  (1489 genes que corresponden al 31,4 % del total de genes). Inicialmente este resultado fue sorprendente atendiendo a los datos existentes sobre un experimento similar en *E. coli*. Stepanova *et al.*, (2007) compararon el patrón de expresión global de una cepa mutante *greB* (*greA<sup>+</sup>greB<sup>-</sup>*) versus una cepa doble mutante *greA greB*. Obtuvieron un total de 19 genes

estimulados y 82 genes reprimidos en la cepa *greAgreB* con un FC de  $\pm 1,5$ , un número muy reducido comparado con los 702 genes estimulados y 787 genes reprimidos detectados en *Salmonella*. Se ha de decir que las comparativas no son idénticas entre ambos trabajos ya que *greAgreB* se comparaba en *E. coli* versus *greB*, mientras que en *Salmonella greAgreB* versus la cepa salvaje. No obstante, teniendo en cuenta el reducido número de genes afectados en la cepa *greB* de *Salmonella* la diferencia de comparativas no afectaría significativamente el resultado final mencionado. Por otro lado las condiciones de cultivo son también diferentes, en *E. coli* las cepas fueron crecidas en LB en agitación a 30 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,4 (fase logarítmica), mientras que en *Salmonella* se crecieron en LB en agitación a 37 °C hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 (inicio fase estacionaria). Sin duda las diferencias de temperatura y fase de crecimiento, podrían explicar las diferencias tan importantes del impacto de los factores Gre en la fisiología de la bacteria. Otra diferencia relevante es, obviamente el organismo modelo, por lo que se podría especular que los factores Gre podrían tener un efecto regulador más patente en *Salmonella* frente a *E. coli*. Estudios comparativos entre ambas bacterias, modificando las condiciones ambientales y fisiológicas serían necesarias para aclarar este aspecto. Stepanova *et al* (2007) proponen que el efecto tan moderado de GreA sobre el genoma de *E. coli* podría deberse a la baja expresión de *greA* y/o a que GreA podría estar presente en una conformación que previene la interacción con ARNpol. Mientras que su actividad podría verse estimulada bajo diferentes condiciones de estrés como choque térmico, ácido o algún tratamiento con antibióticos (Len *et al.*, 2004) (Singh *et al.*, 2001). Cuando comparamos los genes afectados en *E. coli* y *Salmonella*, entre los genes estimulados por GreA de *E. coli*, nosotros encontramos que muchos de ellos no están afectados en *Salmonella*, al menos de manera significativa, a excepción del gen *yijF*, que codifica para una proteína conservada no caracterizada, que se encontró también estimulado en la cepa mutante *greAgreB* con un FC de -8,02. El gen *dgoT*, que codifica para un transportador del D-galactonato, se encontró estimulado en *E. coli* y reprimido en *Salmonella* con un FC de 2,84. Dentro de los 82 genes reprimidos por GreA de *E. coli*, 27 genes también fueron detectados en *Salmonella*. Estos genes

codifican en su mayoría para proteínas involucradas en el metabolismo principalmente de carbohidratos, y transporte de péptidos y proteínas.

Otro dato relevante derivado de los microarrays se obtuvo al diferenciar entre genes del *core genome* y genes adquiridos mediante transferencia horizontal (HGT). En *Salmonella*, la cantidad de genes HGT regulados por los factores Gre es muy importante, representando un porcentaje de genes superior al correspondiente para los genes del *core genome*. Los factores Gre afectan al 29,7 % de los genes del *core genome* y 43,3 % de los genes HGT. Estas diferencias todavía se hacen más significativas si diferenciamos entre genes reprimidos o estimulados por los factores Gre. Los factores Gre estimulan directa o indirectamente al 12,6 % de los genes *core genome* y al 30,2 % de los genes HGT. Desde un punto de vista cuantitativo, los factores Gre ejercen un efecto represor predominante sobre los genes del *core genome* (estimulan al 12,6 % y reprimen al 17,1 % de los genes). Las categorías funcionales en las que ejerce un papel predominante como represor estarían englobadas dentro del metabolismo celular. Este efecto represor del metabolismo también ha sido descrito en *E. coli* (Stepanova *et al.*, 2007). Entre las categorías funcionales del *core genome* en que los factores Gre actuaban principalmente estimulando, se resaltan aquellas relacionadas con la interacción con el medio extracelular (procesos celulares y envuelta celular), así como la síntesis proteica.

Como ya se ha comentado resulta difícil explicar fenómenos de represión directa. Si bien se podría proponer que para la correcta expresión de ciertos genes podría requerirse la existencia de una pausa durante el proceso de elongación, de forma que la ausencia de los factores Gre podría favorecer su expresión. La cantidad tan elevada de genes supuestamente reprimidos por los factores Gre nos lleva a proponer que posiblemente la represión podría ser debida a un efecto indirecto sobre la expresión de factores reguladores presentes en la célula. Uno podría plantear que los factores Gre son esenciales para la expresión de ciertos factores represores. Por tanto, en la cepa mutante *greAgreB* al no producirse la expresión del hipotético represor se causaría la inducción de todos aquellos genes reprimidos por el factor en cuestión. Nuestros resultados muestran que los

factores Gre afectan a un diverso grupo de reguladores transcripcionales. Otro mecanismo que posiblemente contribuya a la estimulación detectada en la cepa *greAgreB* es la competencia existente entre los factores Gre y otras proteínas, como DksA, por la interacción con el canal secundario de la ARNpol. En *E. coli* se demostró que en una cepa mutante DksA se producía la sobreexpresión de los genes flagelares. Al estudiar en detalle el mecanismo se vio que esta inducción era debida a que en ausencia de DksA, la interacción de los factores Gre con la ARN polimerasa se veía favorecida, al haberse eliminado un competidor, y era esta interacción Gre-RNAPol la que promovía la expresión de estos genes (Aberg *et al.*, 2009). Obviamente al eliminarse los factores Gre de la célula estamos eliminando componentes importantes del sistema de competencia por el canal secundario que podría explicar parte de la estimulación detectada. La existencia de mecanismos diversos de acción de los factores Gre (directo, indirecto, competencia) posiblemente explican tanto los genes reprimidos como los estimulados.

Dentro de los genes HGT encontramos más genes estimulados que reprimidos. Esto resulta interesante, puesto que sugiere que los factores Gre podrían ser claves para la correcta expresión de genes que se incorporan horizontalmente a la célula bacteriana, lo que podría indicar que la transcripción de estos genes no es eficiente, produciéndose pausas durante la transcripción que serían liberadas por los factores Gre. Se ha descrito que la expresión de los genes HGT se encuentra muy finamente regulada para evitar que cause un efecto negativo en el *fitness* celular. De hecho se ha descrito la existencia de proteínas que actúan como centinelas, que promueven la represión transcripcional de estos genes una vez llegan a la célula recipiente (Baños *et al.*, 2009) (Revisión Dorman, 2014). Nuestros resultados sugerirían que al contrario que las proteínas centinelas que reprimen la expresión en condiciones no permisivas, los factores Gre estarían ejerciendo un papel de comodín de la transcripción de estos genes adquiridos horizontalmente que presentan una transcripción ineficiente. Si bien efectivamente el papel estimulador de los factores Gre sobre los genes HGT es evidente (30,2 % de los genes HGT), también existen algunos elementos

reprimidos en las condiciones ensayadas como sería el caso de los plásmidos pRSF1010 y pCol1B, y ciertos bacteriófagos como Fels-1.

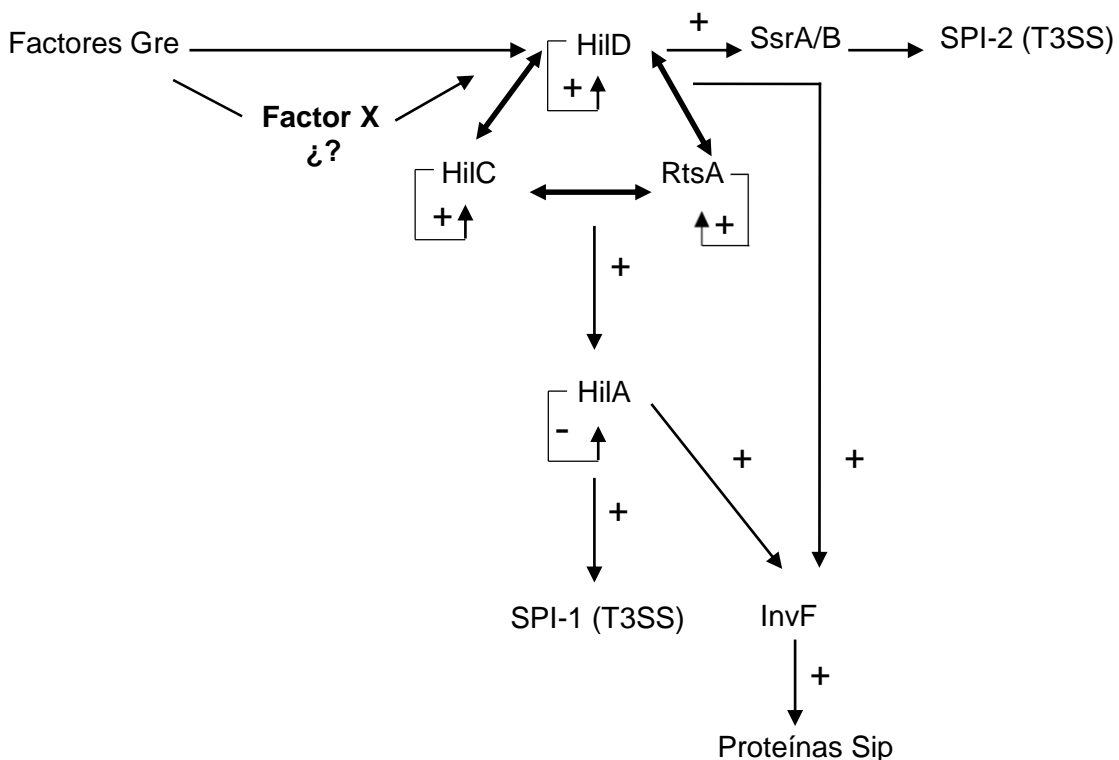
Los resultados también indicaron que el patrón general de expresión génica de *Salmonella* es el resultado de una compleja interacción entre los factores Gre y la proteína DksA, que implica el control mutuo, competición por la unión a la ARNpol, y la acción similar u opuesta sobre la actividad de la ARNpol. Los resultados mostraron que tanto los factores Gre como la proteína DksA parecen jugar un papel bastante relevante en la estimulación de la expresión de los genes HGT aunque más marcadamente los factores Gre que la proteína DksA. Vinella *et al.*, (2012) demostraron que GreA y DksA de *E. coli* presentan funciones redundantes en algunos puntos de la regulación en la fase de crecimiento, pero que también existen promotores en los que GreA y DksA ejercen funciones opuestas. También se ha descrito que GreB al ser la proteína menos abundante en la célula, en comparación con DksA y GreA, una mutación en el gen *greB* puede ser aliviada por la proteína DksA.

En este trabajo se profundizó en el estudio del papel de los factores Gre en la regulación de la expresión transcripcional de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Inicialmente hubo dos datos que nos indicaron un posible efecto de los factores Gre en la expresión de los genes de la SPI-1: 1) la importante reducción de la citotoxicidad frente a eritrocitos y 2) la ausencia de invasión de células epiteliales en la cepa deficiente en los factores Gre, indicando que estos factores podrían ser requeridos para la expresión de los genes SPI-1. Nuestros resultados muestran que los factores Gre no regulan de manera directa la expresión de las proteínas efectoras secretadas por el T3SS-1, ya que la inducción ectópica de la proteína HilA, regulador principal de la SPI-1, fue suficiente para restaurar la expresión de las proteínas efectoras codificadas en SPI-1 en cepas deficientes de los factores Gre. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los factores Gre directa o indirectamente regulan la expresión de HilA. Efectivamente, experimentos tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico evidenciaron que la ausencia de los factores Gre causa la no inducción de la expresión de *hilA* en fase estacionaria de crecimiento.

La expresión de *hilA* se encuentra finamente regulada mediante un bucle de regulación formado por las proteínas HilD, HilC y RtsA (Ellermeier *et al.*, 2005). Cada una de estas proteínas puede, de manera independiente, unirse al promotor de *hilA*, y la eliminación de alguna de ellas causa una disminución en la expresión de *hilA* en determinadas condiciones ambientales (Ellermeier *et al.*, 2005). Pero ¿por qué *S. Typhimurium* contiene tres proteínas reguladoras de *hilA* formando un *feedforward loop* con una función aparentemente redundante? Varios autores han propuesto tres hipótesis que no son mutuamente excluyentes: 1) HilD, HilC y RtsA son activas bajo diferentes condiciones o inducen la expresión de *hilA* en respuesta a diferentes estreses ambientales. 2) HilD, HilC y RtsA regulan diferencialmente la expresión de otros genes independientemente del efecto sobre la expresión de *hilA*. Éste sería el caso de RtsA que induce la expresión de *invF* de manera independiente de *hilA*, promoviendo la expresión de los genes de los operones *sic/sip* que codifican para proteínas efectoras que median la invasión. Y 3) HilD, HilC y RtsA son necesarias para amplificar la señal de tal manera que una vez que uno de estos genes es activado, la expresión de los otros también es inducida, resultando en una mayor inducción de *hilA* (Ellermeier & Slauch, 2003) (Akbar *et al.*, 2003). Este tipo de regulación por *feedforward loop* es muy común en *Saccharomyces cerevisiae* (Lee *et al.*, 2002).

Nuestros estudios indicaron que de este bucle, *hilC* y *rtsA* no parecían ser relevantes en la regulación mediada por los factores Gre. No obstante HilD parecía jugar un papel crucial. La expresión transcripcional de *hilD* estaba estimulada por los factores Gre. HilD era necesaria para evidenciar la regulación de HilA mediada por los factores Gre y la expresión de las proteínas efectoras de la SPI-1 en ausencia de los factores Gre se recuperaba al inducir la expresión de *hilD* (figura 4.51). Nuestros resultados también demostraron que es necesaria la actividad antipausa de GreA para la correcta expresión de *hilD* y de genes aguas abajo como *hilA* y *sipC*. Todos estos resultados fueron corroborados por los análisis transcriptómicos, ya que se detectó un muy importante efecto de los factores Gre en la expresión transcripcional de la mayoría de los genes de la SPI-1 (36 de los 39 genes). También se detectó un importante efecto de la

mutación en los factores Gre en la expresión de los genes de la SPI-2 (15 de los 34 genes), esto es especialmente relevante ya que las condiciones de crecimiento utilizadas para los ensayos de transcriptómica no son especialmente permisivas para la isla SPI-2. Se ha descrito previamente que *hilD* puede controlar la expresión de *ssrA*, regulador de la expresión de los genes de la SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008) (Martínez *et al.*, 2014). Esta regulación cruzada entre SPI-1 y SPI-2 puede explicar el posible efecto indirecto de los factores Gre sobre los genes de la SPI-2.



**Figura 4.51.** Modelo de regulación de la patogenicidad de *Salmonella* a través de los factores Gre propuesto en este trabajo. HilA es el regulador directo de la SPI-1 que codifica para las proteínas efectoras. HilA está regulado por un bucle de regulación comprendido por las proteínas HilD, HilC y RtsA. El operón SsrA/B es el regulador de la expresión de la SPI-2. En este trabajo se plantea que los factores Gre juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes codificados en la SPI-1 y SPI-2 a través de la regulación de *hilD*.

HilD, además de ser el regulador principal de los activadores transcripcionales de los genes de la SPI-1 y 2, también controla la expresión de otros genes implicados en la virulencia de *Salmonella*. Petrone *et al* (2014), realizaron experimentos de ChIP-seq en la cepa 14028s de *S. Typhimurium* e identificaron

17 regiones de unión de HilD en el genoma. Seis de estas regiones ya habían sido descritas: 4 en la SPI-1 (*hilC*, *hilD*, *hilA* e *invF/invR*) y 2 fuera de ella (*siiA* y *rtsA*). De las 11 nuevas dianas descritas, 9 están localizadas fuera de la SPI1. Realizamos una búsqueda de estas 9 dianas en nuestros resultados de transcriptómica y observamos que 8 de estos genes también están afectados por los factores Gre: 5 estaban estimulados por los factores Gre (*sinR*, *cheM*, *yjiK*, *ipxR* y *flhD*, implicados en transcripción y procesos celulares) y 3 estaban reprimidos: *putB* (transporte de proteínas), *ytfJ* y *ygiK* (sin clasificación). Esto claramente sugiere que la regulación mediada por los factores Gre de *hilD* causa un importante efecto en el correspondiente regulón generando un “efecto abanico” mediante la regulación indirecta de muchos genes aguas abajo de *hilD*.

La siguiente pregunta que nos planteamos es ¿cómo los factores Gre afectan a la transcripción de *hilD*? Un resultado inicialmente contradictorio nos proporcionó importante información sobre el mecanismo. Este resultado fue la discrepancia del análisis transcripcional de *hilD* dependiendo de si utilizábamos una fusión génica con *lacZ* o la determinación de los niveles de mRNA mediante qPCR. No se detecta ningún efecto de los factores Gre usando la fusión génica mientras que se observaba una regulación muy pronunciada a mirar a niveles de ARNm, estos resultados indicaban que el efecto de los factores Gre no actuaba regulando el inicio de transcripción de *hilD*. Estudios posteriores mostraron que la regulación de *hilD* por parte de los factores Gre requiere la presencia de la región 3'UTR del gen, pues únicamente en presencia de esta región, la expresión de *hilD* disminuyó significativamente cuando los factores Gre estaban ausentes (figura 4.28). Se ha descrito en la literatura que las regiones no traducidas del ARNm (UTR's) pueden ser determinantes para la expresión génica al actuar sobre la estabilidad del ARN y la eficiencia de su traducción. El papel de la regiones 5' UTR ha sido extensivamente estudiado, mientras que el papel que juegan las regiones UTR localizadas en el extremo 3' del transcrito es menos conocido (López-Garrido *et al.*, 2014). Los estudios realizados en el grupo de investigación del Dr. Casadesús, han descrito que la región 3'UTR de *hilD* juega un papel crucial en la expresión de los genes de la SPI-1. La ausencia de esta región causa un incremento importante en los niveles del transcrito *hilD*, por tanto



de la proteína HlID y en consecuencia una activación de los genes de la SPI-1. Sus resultados indican que la 3' UTR interviene en la estabilidad del transcrito. En general, los ARNm bacterianos se caracterizan por ser rápidamente degradados. Este rápido *turnover* permite a la célula responder rápidamente frente a alteraciones en el medio ambiente. La inestabilidad de los ARNm es relevante para la apropiada regulación de genes que codifican para proteínas reguladoras y cuyos niveles intracelulares varían rápidamente en respuesta a estímulos ambientales. Se ha visto que a menudo ARNm especialmente inestables contienen secuencias ricas en A-U cercanas a la región 3', estas secuencias se consideran una señal para su rápida degradación. Nuestros resultados muestran que 1) los factores Gre requieren de la región 3'UTR para estimular la síntesis de *hlID* y 2) la actividad antipausa de los factores Gre es necesaria para la estimulación de la expresión de *hlID*. Sabiendo que se ha descrito que la secuencia 3' UTR interviene en la estabilidad del transcrito, la cuestión a responder es ¿cómo regulan los factores Gre la expresión de *hlID*? Podemos plantear dos posibilidades 1) modulando la capacidad de la bacteria de degradar el transcrito *hlID* mediante el control de la expresión de enzimas implicadas en la degradación del ARN o 2) la regulación es consecuencia del control mediado por los factores Gre de la elongación de la transcripción de *hlID*. Nuestros ensayos transcriptómicos muestran que un número considerable de genes implicados en la degradación del ARN son estimulados por los factores Gre. Es decir, en una cepa mutante *greAgreB*, los niveles de ciertas proteínas relacionadas con la degradación del ARN, se encuentran reducidos. Por tanto esto no permitiría explicar el bajo nivel de expresión de *hlID* detectado en la cepa *greAgreB*, por lo que podríamos descartar la primera posibilidad propuesta. Así que nuestro modelo actual se basaría en una regulación de *hlID* mediada por el control a nivel de elongación de la transcripción posiblemente debido a la presencia de una secuencia de pausa localizada en la región 3'UTR. Si bien, nuestros resultados claramente muestran una regulación de la SPI-1 por parte de los factores Gre a través de la 3'UTR de *hlID*, aún desconocemos el mecanismo exacto por el cual esta regulación se está llevando a cabo y si es de manera directa o indirecta. Futuros experimentos estarán enfocados en clonar diferentes fragmentos de la secuencia 3'UTR de *hlID* en un vector de expresión

inducible para demostrar la existencia de secuencias intrínsecas de pausa transcripcional y si es así determinar con precisión cual es la región de la 3'UTR en la cual se están generando los fenómenos de pausa transcripcional y donde los factores Gre estarían ejerciendo su actividad antipausa.

Resulta interesante que en el estudio en el que se identifica la 3'UTR de *hilD* como un importante motivo regulador, también se describió que la 3'UTR es necesaria para la regulación de *hilD* mediada por Hfq. Hfq es una proteína de unión al ARN implicada en la regulación génica y que se ha relacionado con la regulación de SPI-1 por control de *hilA* y *hilD* (Sittka *et al.*, 2007) (Sittka *et al.*, 2008) (López-Garrido *et al.*, 2014). El hecho de que la chaperona Hfq esté involucrada en la regulación de *hilD* es una fuerte evidencia de que la región 3'UTR de *hilD* podría ser también un blanco importante para la regulación por pequeños ARN, a nivel post-transcripcional (López-Garrido *et al.*, 2014). De hecho, se han descrito diferentes factores que podrían ser implicados en la regulación de *hilD* a nivel post-transcripcional, como son SirA, Dam, YfgL, Ack, Pta, y TrkA (López-Garrido & Casadesús, 2010) (Golubeva *et al.*, 2012)..

La regulación de la formación de biofilm también fue analizada en detalle en este trabajo. La capacidad de *Salmonella* para formar biofilm está controlada por una compleja red compuesta de múltiples factores transcripcionales, mensajeros secundarios y pequeños ARNs. La formación del biofilm le proporciona a la célula bacteriana una ventaja en la supervivencia a ambientes desfavorables y ha sido relacionada con la transmisión y la patogénesis de *Salmonella*. Los estudios actuales están enfocados en entender claramente la relación entre el biofilm y las funciones fisiológicas de *Salmonella* en un esfuerzo por desarrollar nuevas estrategias para prevenir la formación de biofilm. La mayoría de las cepas de *S. Typhimurium* aisladas de pacientes, animales y alimentos, muestran el morfotipo rdar en placas de agar conteniendo el colorante Congo red. Este morfotipo caracterizado por la formación de colonias extendidas con superficie seca a temperatura ambiente, indica un comportamiento multicelular y se utiliza para monitorizar la capacidad de formar biofilm. El hecho de que la mayoría de aislamientos sean positivos evidencia la importancia de la formación de biofilm

para la colonización y persistencia en diferentes ambientes (Römling *et al.*, 2003) (Castelijns *et al.*, 2012) (Vestby *et al.*, 2009). En este estudio, se hizo énfasis en analizar la posible relación entre los factores Gre y la formación de biofilm en *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos mostraron que los factores Gre son necesarios para la correcta expresión del gen *csgD* y subsecuente formación de biofilm en *Salmonella* en las condiciones experimentales establecidas (baja osmolaridad a 28 °C). El promotor del gen *csgD* está bajo el control de una compleja red de regulación transcripcional compuesta por varias proteínas reguladoras que compiten entre sí por los sitios de unión al promotor de *csgD* en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Nuestros resultados mostraron que los factores Gre intervienen en la formación de biofilm regulando la transcripción del gen *csgD*. Para esta regulación es necesaria la región 5' UTR. Gerstel *et al.*, (2006) describieron que la región 5' UTR de *csgD* es necesaria para la regulación positiva de la transcripción de *csgD* en fase estacionaria de crecimiento, pues en ausencia de esta región los niveles de expresión de *csgD* disminuyen drásticamente. Nuestros resultados indican que la región 5'UTR de *csgD* podría ser un posible lugar de pausa durante la transcripción. Cabe resaltar que las condiciones en las que se realizaron los experimentos de Gerstel *et al* (cultivo líquido en microaerofilia) son diferentes a las nuestras (cultivos en placa). En otros trabajos se ha demostrado que la región 5'UTR del gen *csgD* determina la estabilidad del ARNm. Al estabilizar el ARNm podría tener un efecto indirecto sobre el aumento de la traducción al permitir la interacción de pequeños ARNs con la región 5'UTR y hacer más asequible la secuencia de unión al ribosoma (Pereira *et al.*, 2001) (Zengel *et al.*, 2002) (Komarova *et al.*, 2005) (Lease & Belfort, 2000). Según nuestros resultados, los factores Gre al parecer, tienen preferencia por la regulación génica a nivel transcripcional en las regiones UTR. Tal vez porque son regiones más sensibles a las pausas durante el proceso de transcripción y precisan ser finamente reguladas pues su éxito determina la continuidad de la transcripción y posterior traducción.

La expresión de *csgD* es óptima a bajas temperaturas (28 °C) y en ausencia de NaCl. En este trabajo también se observó un efecto de los factores Gre sobre la formación de biofilm a 37 °C en ausencia de NaCl. Este efecto fue observado

utilizando la cepa MAE52 que presenta una mutación puntual en el promotor del gen *csgD* que desvincula la dependencia que tiene la expresión de *csgD* por el factor sigma alternativo RpoS y permite que la expresión de *csgD* aumente 3 veces independientemente de la temperatura (Römling *et al.*, 1998) (Zakikhany *et al.*, 2010). Es interesante resaltar el hecho de que la expresión transcripcional de los genes *csgD* y *rpoD* analizadas en los ensayos de microarrays en una cepa mutante *greAgreB*, no se vieron afectadas a 37 °C posiblemente por las condiciones experimentales usadas para los microarrays (LB en presencia de NaCl y agitación).

La formación de biofilm se considera un factor de antivirulencia en infecciones de *Salmonella*. Muchas de las infecciones crónicas que incluyen la formación de biofilm están asociadas con un incremento de las concentraciones intracelulares de c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). En *S. Typhimurium*, los niveles elevados de c-di-GMP inhiben uno de los principales fenotipos de virulencia como es la invasión de células epiteliales HT-29. c-di-GMP es un mensajero secundario responsable de la regulación de muchas funciones biológicas, incluyendo la formación de biofilm al inducir la síntesis de celulosa, motilidad, virulencia y diferenciación celular (Sambanthamoorthy *et al.*, 2012). En la regulación de la virulencia, c-di-GMP puede intervenir mediante inducción de la producción de celulosa ya que ésta inhibe la invasión restringiendo el contacto de la bacteria con la célula hospedadora, evitando que el T3SS pueda inyectar las proteínas efectoras. También se han descrito otros mecanismos inhibidores de la invasión independientes de componentes de la matriz extracelular que implicarían ciertas proteínas efectoras como SipA y SopE2. Sorprendentemente en estos mecanismos interviene CsgD, si bien, la intervención tiene lugar aguas debajo de HilA (Ahmad *et al.*, 2011) (Lamprokostopoulou *et al.*, 2010). La regulación por parte de los factores Gre de ambas vías, patogénesis y formación de biofilm, que al parecer son contrarias en cuanto a función en la fisiología celular, sucedería de manera independiente una de la otra ya que han sido estudiadas bajo diferentes condiciones. Baja temperatura como condición no permisiva de SPI-1 y permisiva para biofilm y alta temperatura como permisiva para SPI-1 y no permisiva para biofilm. Todos los resultados obtenidos en este trabajo, muestran

que los factores Gre juegan un papel clave en la fisiología de *Salmonella* y son componentes esenciales para el control transcripcional de este microorganismo.

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

- Al igual que en *E. coli*, el gen *greA* de *Salmonella* se encuentra autorregulado negativamente en presencia de la proteína GreA.
- La expresión del gen *greB* de *Salmonella*, al igual que en *E. coli*, no se encuentra autorregulada.
- Existe una elevada conservación de secuencia entre los genes *greA* y *greB* y las proteínas GreA y GreB de *E. coli* y *Salmonella*.
- La proteína GreA de *E. coli* es capaz de complementar la mutación del gen *greA* de *Salmonella*.
- Los factores Gre de *Salmonella* son importantes para la correcta expresión de genes relacionados con procesos celulares como motilidad, lisis de eritrocitos y estrés oxidativo.
- La ausencia de los factores Gre afecta la expresión de numerosos genes de la SPI-1.
- La regulación de los genes de la SPI-1 mediada por los factores Gre es a través de la regulación transcripcional del gen *hilD*.
- Para la regulación de los genes de la SPI-1 mediada por los factores Gre se requiere de la región 3'UTR del gen *hilD*.
- La regulación mediada por los factores Gre de *ssrA*, principal regulador de la SPI-2, requiere la presencia de *hilD*.
- Los factores Gre juegan un papel importante en la expresión transcripcional de *csgD*, principal regulador de la formación de biofilm en *Salmonella*.



- La regulación del gen *csgD* mediada por los factores Gre requiere de la región 5'UTR de *csgD* y es independiente de la temperatura.
- En ausencia de los factores Gre, el *core genome* de *Salmonella* presentó un importante número de genes afectados. De estos, los factores Gre estimularon el 12,6 % y reprimieron el 17,1 %.
- Los factores Gre ejercen en general un papel represor en las categorías englobadas dentro del metabolismo celular de *Salmonella*.
- Los factores Gre ejercen un papel estimulador principalmente en las categorías relacionadas con la interacción con el medio extracelular (procesos celulares y envuelta celular) y síntesis proteica.
- En ausencia de los factores Gre, un elevado porcentaje (43,3 %) de los genes HGT de *Salmonella* están afectados. La mayoría de estos genes resultaron estimulados por los factores Gre.
- Existe una importante correulación por los factores Gre y la proteína DksA en la expresión génica de *Salmonella*, indicando un posible control mutuo y/o competencia por la unión a la ARNpol.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, A., Fernández-Vázquez, J., Cabrer-Panes, J. D., Sánchez, A., & Balsalobre, C. (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3226–36.
- Aberg, A., Shingler, V., & Balsalobre, C. (2006). (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Molecular Microbiology*, *60*(6), 1520–33.
- Aberg, A., Shingler, V., & Balsalobre, C. (2008). Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Molecular Microbiology*, *67*(6), 1223–41.
- Ahmad, I., Lamprokostopoulou, A., Le Guyon, S., Streck, E., Barthel, M., Peters, V., Römling, U. (2011). Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PloS One*, *6*(12), e28351.
- Ahmad, I., Wigren, E., Le Guyon, S., Vekkei, S., Blanka, A., El Mouali, Y., Römling, U. (2013). The EAL-like protein STM1697 regulates virulence phenotypes, motility and biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, *90*(6), 1216–32.
- Akbar, S., Schechter, L. M., Lostroh, C. P., & Lee, C. A. (2003). AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, *47*(3), 715–28.
- Altier, C. (2005). Genetic and environmental control of salmonella invasion. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *43 Spec No*, 85–92.
- Artsimovitch, I., & Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7090–5.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., & Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, *162*(2), 295–301.

- Bae, Y.-M., Baek, S.-Y., & Lee, S.-Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(3), 465–73.
- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C., & Lee, C. A. (1996). Coordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Molecular Microbiology*, *22*(4), 703–14.
- Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (2000). Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, *182*(8), 2341–4.
- Baños, R. C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C., & Juárez, A. (2009). Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genetics*, *5*(6).
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, *60*, 131–47.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, *64*(5), 1862–5.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L., & Jones, B. D. (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infection and Immunity*, *71*(3), 1295–305.
- Baxter, M. A., & Jones, B. D. (2005). The fimYZ genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infection and Immunity*, *73*(3), 1377–85.
- Baxter, M. A., & Jones, B. D. (2015). Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, *83*(3), 978–85.
- Beloin, C., & Ghigo, J.-M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, *13*(1), 16–9.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., &

- Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–97.
- Beuzón, C. R., Unsworth, K. E., & Holden, D. W. (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. *Infection and Immunity*, 69(12), 7254–61.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., & Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 998–1004.
- Blankschien, M. D., Potrykus, K., Grace, E., Choudhary, A., Vinella, D., Cashel, M., & Herman, C. (2009). TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genetics*, 5(1).
- Boddicker, J. D., Knosp, B. M., & Jones, B. D. (2003). Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *Journal of Bacteriology*, 185(2), 525–33.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2), 95–113.
- Borukhov, S., Lee, J., & Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*, 55(5), 1315–24.
- Borukhov, S., & Nudler, E. (2008). RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends in Microbiology*, 16(3), 126–34.
- Borukhov, S., Sagitov, V., & Goldfarb, A. (1993). Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell*, 72(3), 459–66.
- Bowen, A., Fry, A., Richards, G., & Beuchat, L. (2006). Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infection*, 134(4), 675–85.
- Boyle, E. C., Brown, N. F., & Finlay, B. B. (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cellular Microbiology*, 8(12), 1946–57.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR

- family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145–63.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 57–65.
- Bullas, L. R., & Ryu, J. I. (1983). *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *Journal of Bacteriology*, 156(1), 471–4.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., & Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14591–6.
- Caldwell, A. L., & Gulig, P. A. (1991). The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene. *Journal of Bacteriology*, 173(22), 7176–85.
- Campbell, G. R. O., Sharypova, L. A., Scheidle, H., Jones, K. M., Niehaus, K., Becker, A., & Walker, G. C. (2003). Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3853–62.
- Cashel, M. (1969). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3133–41.
- Castelijin, G. A. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28(1), 51–63.
- Chevance, F. F. V., & Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(6), 455–465.
- Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 694–708.
- China, A., Mishra, S., & Nagaraja, V. (2011). A transcript cleavage factor of

- Mycobacterium tuberculosis* important for its survival. *PLoS One*, 6(7).
- China, A., Mishra, S., Tare, P., & Nagaraja, V. (2012). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase by binding of a Gre factor homolog to the secondary channel. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1009–17.
- Chubiz, J. E. C., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D., & Slauch, J. M. (2010). FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 192(23), 6261–70.
- Ciampi, M. S. (2006). Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 9), 2515–28.
- Clegg, S., & Hughes, K. T. (2002). FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1209–13.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112–8.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–4.
- Collazo, C. M., & Galán, J. E. (1997). The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review. *Gene*, 192(1), 51–9.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435–64.
- Cotter, P. A., & DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annual Review of Microbiology*, 54, 519–65.
- Crawford, R. W., Gibson, D. L., Kay, W. W., & Gunn, J. S. (2008). Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infection and Immunity*, 76(11), 5341–9.
- Crawford, R. W., Reeve, K. E., & Gunn, J. S. (2010). Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2981–90.



- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *183*(9), 2888–96.
- Cummings, B. (2006). *Microbiology: An Introduction*. Pearson Benjamin Cummings. 9th edition. San Francisco, CA.
- Cummings, L. A., Wilkerson, W. D., Bergsbaken, T., & Cookson, B. T. (2006). In vivo, fliC expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Molecular Microbiology*, *61*(3), 795–809.
- Darwin, K. H., & Miller, V. L. (2000). The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Molecular Microbiology*, *35*(4), 949–60.
- Darwin, K. H., & Miller, V. L. (2001). Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO Journal*, *20*(8), 1850–62.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6640–5.
- De Oliveira, D. C. V., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araújo Júnior, J. P., Silva, N. C. C., & Rall, V. L. M. (2014). Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, *11*(6), 478–83.
- deHaseth, P. L., & Helmann, J. D. (1995). Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Molecular Microbiology*, *16*(5), 817–24.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J. E., Gleeson, C., Holden, D. W., & Hensel, M. (1998). Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *Journal of Bacteriology*, *180*(18), 4775–80.
- DeVinney, R., Steele-Mortimer, O., & Finlay, B. B. (2000). Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends in*

- Microbiology*, 8(1), 29–33.
- Dillon, S. C., & Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 185–95.
- Dorman, C. J. (2014). H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. *Plasmid*, 75, 1–11.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127–45.
- Eichelberg, K., Hardt, W. D., & Galán, J. E. (1999). Characterization of SprA, an AraC-like transcriptional regulator encoded within the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 1. *Molecular Microbiology*, 33(1), 139–52.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2005). HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 57(3), 691–705.
- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A., & Slauch, J. M. (2002). Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene*, 290(1-2), 153–61.
- Ellermeier, C. D., & Slauch, J. M. (2003). RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5096–108.
- Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2007). Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Current Opinion in Microbiology*, 10(1), 24–9.
- Erickson, D. L., Lines, J. L., Pesci, E. C., Venturi, V., & Storey, D. G. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* *relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infection and Immunity*, 72(10), 5638–45.
- Erie, D. A., Hajiseyedjavadi, O., Young, M. C., & von Hippel, P. H. (1993). Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5135), 867–73.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., & Hinton, J. C. D. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling

- of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 47(1), 103–18.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., & Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9761–6.
- Ewen, S. W., Naughton, P. J., Grant, G., Sojka, M., Allen-Vercoe, E., Bardocz, S., Pusztai, A. (1997). *Salmonella enterica* var Typhimurium and *Salmonella enterica* var Enteritidis express type 1 fimbriae in the rat in vivo. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 18(3), 185–92.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341.
- Farinha, M. A., & Kropinski, A. M. (1990). Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *Journal of Bacteriology*, 172(6), 3496–9.
- Fass, E., & Groisman, E. A. (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 199–204.
- Field, T. R., Layton, A. N., Bispham, J., Stevens, M. P., & Galyov, E. E. (2008). Identification of novel genes and pathways affecting *Salmonella* type III secretion system 1 using a contact-dependent hemolysis assay. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3393–3398.
- Figuroa Ochoa, I. M., & Verdugo Rodríguez, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 25–42.
- Figuroa-Bossi, N., & Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 33(1), 167–76.
- Figuroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., & Bossi, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 39(2), 260–71.
- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(2), 136–69.
- Fish, R. N., & Kane, C. M. (2002). Promoting elongation with transcript cleavage

- stimulatory factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577(2), 287–307.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.-D., Ozören, N., Jagirdar, R., Núñez, G. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *salmonella*-infected macrophages. *Nature Immunology*, 7(6), 576–82.
- Fu, Y., & Galán, J. E. (1999). A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 401(6750), 293–7.
- Galán, J. E. (1996). Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 209, 43–60.
- García Véscovi, E., Soncini, F. C., & Groisman, E. A. (1996). Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84(1), 165–74.
- Gerlach, R. G., Jäckel, D., Geymeier, N., & Hensel, M. (2007). *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 75(10), 4697–709.
- Gerstel, U., Kolb, A., & Römling, U. (2006). Regulatory components at the *csgD* promoter - Additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region. *FEMS Microbiology Letters*, 261(1), 109–117.
- Gerstel, U., Park, C., & Römling, U. (2003). Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, 49(3), 639–54.
- Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638–48.
- Gerstel, U., & Römling, U. (2003). The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 154(10), 659–67.
- Ghosh, P., Ishihama, A., & Chatterji, D. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(17), 4621–7.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2012). Integrating

- global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics*, 190(1), 79–90.
- Gong, H., Vu, G.-P., Bai, Y., Yang, E., Liu, F., & Lu, S. (2010). Differential expression of *Salmonella* type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 1), 116–27.
- Gordon, M. (2008). *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *The Journal of Infection*, 56(6), 413–422.
- Gourse, R. L., Ross, W., & Rutherford, S. T. (2006). General pathway for turning on promoters transcribed by RNA polymerases containing alternative sigma factors. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4589–91.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., & Römling, U. (2010). Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 456–66.
- Grimont Pad and Weill FX. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Groisman, E. A. (1998). The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(1), 96–101.
- Gruenheid, S., & Finlay, B. B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, 422(6933), 775–781.
- Guiney, D. G., & Fierer, J. (2011). The Role of the spv Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2, 129.
- Guo, A., Lasaro, M. A., Sirard, J.-C., Kraehenbühl, J.-P., & Schifferli, D. M. (2007). Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 1059–69.
- Gusarov, I., & Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular Cell*, 3(4), 495–504.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121–30.

- Hamilton, S., Bongaerts, R. J. M., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., ... Hinton, J. C. D. (2009). The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, *10*, 599.
- Hammer, B. K., Tateda, E. S., & Swanson, M. S. (2002). A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, *44*(1), 107–18.
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, *204*, 63–113.
- Haralalka, S., Nandi, S., & Bhadra, R. K. (2003). Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. *Journal of Bacteriology*, *185*(16), 4672–82.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., & Galán, J. E. (1998). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*, *93*(5), 815–26.
- Haugen, S. P., Ross, W., & Gourse, R. L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(7), 507–19.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Hinton, J. C. D. (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. *Cellular Microbiology*, *10*(4), 958–84.
- Hayward, R. D., & Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *The EMBO Journal*, *18*(18), 4926–34.
- Henard CA, V.-T. A. (2012). DksA-dependent resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against the antimicrobial activity of inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*, *80*(4), 1373–80.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Current Opinion in Microbiology*, *5*(6), 591–5.
- Henkin, T. M. (2000). Transcription termination control in bacteria. *Current*

- Opinion in Microbiology*, 3(2), 149–53.
- Hensel, M., Nikolaus, T., & Egelseer, C. (1999). Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*, 31(2), 489–98.
- Hensel, M., Shea, J. E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., ... Holden, D. W. (1997). Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Molecular Microbiology*, 24(1), 155–67.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G. Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Molecular Microbiology*, 30(1), 163–74.
- Hernandez, L. D. Hueffer K, Wenk MR, G. J. (2004). *Salmonella* Modulates Vesicular Traffic by Altering Phosphoinositide Metabolism. *Science*, 304(5678), 1805–1807.
- Holmqvist, E., Reimegård, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Römling, U., & Wagner, E. G. H. (2010). Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *The EMBO Journal*, 29(11), 1840–50.
- Hook-Barnard, I., Johnson, X. B., & Hinton, D. M. (2006). *Escherichia coli* RNA polymerase recognition of a sigma70-dependent promoter requiring a -35 DNA element and an extended -10 TGn motif. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8352–9.
- Hoskins, J., Alborn, W. E., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Glass, J. I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5709–17.
- Hutchison, C. A., Peterson, S. N., Gill, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5447), 2165–9.
- Hüttener, M., Dietrich, M., Paytubi, S., & Juárez, A. (2014). HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042. *BMC Microbiology*, 14, 268.

- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)*, 4(2), 249–64.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology*, 54, 499–518.
- Iyoda, S., Kamidoi, T., Hirose, K., Kutsukake, K., & Watanabe, H. (2001). A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*, 30(2), 81–90.
- Jain, S., & Chen, J. (2007). Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2473–9.
- Jones, M. A., Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (1998). Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infection and Immunity*, 66(12), 5799–804.
- Jones, R. M., Wu, H., Wentworth, C., Luo, L., Collier-Hyams, L., & Neish, A. S. (2008). *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host & Microbe*, 3(4), 233–44.
- Jude, F., Köhler, T., Branny, P., Perron, K., Mayer, M. P., Comte, R., & van Delden, C. (2003). Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3558–66.
- Kage, H., Takaya, A., Ohya, M., & Yamamoto, T. (2008). Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2470–8.
- Kang, P. J., & Craig, E. A. (1990). Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *Journal of Bacteriology*, 172(4), 2055–64.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B., & Galán, J. E. (1996). A secreted protein



- tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 21(3), 633–41.
- Klein, J. R., & Jones, B. D. (2001). Salmonella pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infection and Immunity*, 69(2), 737–43.
- Klinkenberg, L. G., Lee, J.-H., Bishai, W. R., & Karakousis, P. C. (2010). The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(9), 1397–404.
- Knodler, L. A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B. A., & Steele-Mortimer, O. (2005). Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infection and Immunity*, 73(10), 7027–31.
- Knodler, L. A., Celli, J., Hardt, W.-D., Vallance, B. A., Yip, C., & Finlay, B. B. (2002). *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1089–103.
- Komarova, A. V., Tchufistova, L. S., Dreyfus, M., & Boni, I. V. (2005). AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1344–9.
- Komissarova, N., & Kashlev, M. (1997). RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15329–38.
- Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S., & Aizawa, S. I. (1999). Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 34(4), 767–79.
- Kröger, C., Dillon, S. C., Cameron, A. D. S., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., Hinton, J. C. D. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), E1277–86.

- Kropinski, A. M., Sulakvelidze, A., Konczy, P., & Poppe, C. (2007). *Salmonella* phages and prophages--genomics and practical aspects. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 394, 133–75.
- Kulish, D., Lee, J., Lomakin, I., Nowicka, B., Das, A., Darst, S., Borukhov, S. (2000). The functional role of basic patch, a structural element of *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12789–98.
- Kusuya, Y., Kurokawa, K., Ishikawa, S., Ogasawara, N., & Oshima, T. (2011). Transcription factor GreA contributes to resolving promoter-proximal pausing of RNA polymerase in *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3090–9.
- Lamour, V., Rutherford, S. T., Kuznedelov, K., Ramagopal, U. A., Gourse, R. L., Severinov, K., & Darst, S. A. (2008). Crystal structure of *Escherichia coli* Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein. *Journal of Molecular Biology*, 383(2), 367–79.
- Lamprokostopoulou, A., Monteiro, C., Rhen, M., & Römling, U. (2010). Cyclic di-GMP signalling controls virulence properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at the mucosal lining. *Environmental Microbiology*, 12(1), 40–53.
- Lanie, J. A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Winkler, M. E. (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *Journal of Bacteriology*, 189(1), 38–51.
- Laptenko, O., Kim, S.-S., Lee, J., Starodubtseva, M., Cava, F., Berenguer, J., Borukhov, S. (2006). pH-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation. *The EMBO Journal*, 25(10), 2131–41.
- Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., & Borukhov, S. (2003). Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 22(23), 6322–34.
- Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2009). *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infection and Immunity*,

- 77(7), 2635–42.
- Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., Lasa, I. (2012). *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *Journal of Bacteriology*, 194(14), 3708–22.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1322–39.
- Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., & Altier, C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1633–45.
- Lease, R. A., & Belfort, M. (2000). Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Molecular Microbiology*, 38(4), 667–72.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S., & Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 771–81.
- Lee, C. A., Jones, B. D., & Falkow, S. (1992). Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1847–51.
- Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K., Young, R. A. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 799–804.
- Len, A. C. L., Harty, D. W. S., & Jacques, N. A. (2004). Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 5), 1339–51.
- Li, J., Overall, C. C., Johnson, R. C., Jones, M. B., McDermott, J. E., Heffron, F., Cambronne, E. D. (2015). ChIP-Seq Analysis of the  $\sigma$ E Regulon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveals New Genes Implicated in Heat Shock and Oxidative Stress Response. *PLoS One*, 10(9).
- Li, K., Jiang, T., Yu, B., Wang, L., Gao, C., Ma, C., Ma, Y. (2012). Transcription elongation factor GreA has functional chaperone activity. *PLoS One*, 7(12).
- Li, X. Y., & McClure, W. R. (1998). Characterization of the closed complex

- intermediate formed during transcription initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23549–57.
- Lilic, M., Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Egelman, E. H., & Stebbins, C. E. (2003). *Salmonella* SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5641), 1918–21.
- Lin, D., Rao, C. V., & Slauch, J. M. (2008). The *Salmonella* SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 87–97.
- Linder, E. (1995). Toxicología de los alimentos. *Editorial Acribia. Zaragoza España*, 53–65.
- Liu, Z., Niu, H., Wu, S., & Huang, R. (2014). CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerging Microbes & Infections*, 3(1).
- López-Garrido, J., & Casadesús, J. (2010). Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics*, 184(3), 637–49.
- López-Garrido, J., Puerta-Fernández, E., & Casadesús, J. (2014). A eukaryotic-like 3' untranslated region in *Salmonella enterica* *hilD* mRNA. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 5894–906.
- Lostroh, C. P., & Lee, C. A. (2001). The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 3(14-15), 1281–91.
- Lucas, R. L., & Lee, C. A. (2001). Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2733–45.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 13(5), 236–42.
- Main-Hester, K. L., Colpitts, K. M., Thomas, G. A., Fang, F. C., & Libby, S. J. (2008). Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 76(3), 1024–35.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C., & Steele-

- Mortimer, O. (2011). *Salmonella* - at home in the host cell. *Frontiers in Microbiology*, 2, 125.
- Maloy SR, Stewart VJ, T. R. (1996). Genetic analysis of pathogenic bacteria. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 465.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(2), 145–56.
- Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J., & Bustamante, V. H. (2014). HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *Journal of Bacteriology*, 196(21), 3746–55.
- Matsui, H., Bacot, C. M., Garlington, W. A., Doyle, T. J., Roberts, S., & Gulig, P. A. (2001). Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4652–8.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Clifton, S. W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., Wilson, R. K. (2004). Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics*, 36(12), 1268–74.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Wilson, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852–6.
- McDowell, J. C., Roberts, J. W., Jin, D. J., & Gross, C. (1994). Determination of intrinsic transcription termination efficiency by RNA polymerase elongation rate. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5186), 822–5.
- McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., & Koronakis, V. (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 117–24.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D., & Koronakis, V. (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *The EMBO Journal*, 20(9), 2131–9.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D., & Koronakis, V. (2004). Control of actin turnover

- by a *salmonella* invasion protein. *Molecular Cell*, 13(4), 497–510.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569–75.
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Bäumlér, A. J., & Miller, S. I. (1999). *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Molecular Microbiology*, 34(4), 850–64.
- Mika, F., & Hengge, R. (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4560–79.
- Miki, T., Okada, N., & Danbara, H. (2004). Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34631–42.
- Miki, T., Okada, N., Shimada, Y., & Danbara, H. (2004). Characterization of *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*, 37(2), 65–72.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Mirolid, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Hardt, W. D. (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9845–50.
- Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T., & Aizawa, S.-I. (2008). Signal Pathway in Salt-Activated Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4624–4631.
- Morgan, E., Campbell, J. D., Rowe, S. C., Bispham, J., Stevens, M. P., Bowen, A. J., Wallis, T. S. (2004). Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 54(4),

- 994–1010.
- Müller, A. J., Kaiser, P., Dittmar, K. E. J., Weber, T. C., Haueter, S., Endt, K., ... Hardt, W.-D. (2012). *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host & Microbe*, 11(1), 19–32.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(22), 4187–9.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., & Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5571), 1285–90.
- Myeni, S. K., & Zhou, D. (2010). The C Terminus of SipC Binds and Bundles F-actin to Promote *Salmonella* Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13357–13363.
- Nachin, L., Nannmark, U., & Nyström, T. (2005). Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6265–72.
- Nag, J. K., Shrivastava, N., Chahar, D., Gupta, C. L., Bajpai, P., & Misra-Bhattacharya, S. (2014). *Wolbachia* transcription elongation factor “Wol GreA” interacts with  $\alpha 2\beta\beta'\sigma$  subunits of RNA polymerase through its dimeric C-terminal domain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2930.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., & Sanjuan, J. (2002). *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 15(3), 225–32.
- Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E., & Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14057–9.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., & Goldfarb, A. (1997). The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of

- RNA polymerase. *Cell*, 89(1), 33–41.
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259–74.
- Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W. J., Wriggers, W., & Darst, S. A. (2003). Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell*, 114(3), 335–45.
- Orlova, M., Newlands, J., Das, A., Goldfarb, A., & Borukhov, S. (1995). Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4596–600.
- Österberg, S., del Peso-Santos, T., & Shingler, V. (2011). Regulation of alternative sigma factor use. *Annual Review of Microbiology*, 65, 37–55.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. and Tenover F.C., & Tenover F.C. and Tenover F.C. (1999). Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. *Mycopathologia*, 146(2), 107–108.
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J., & Farrar, J. J. (2002). Typhoid fever. *The New England Journal of Medicine*, 347(22), 1770–82.
- Patel, J. C., & Galan, J. E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *The Journal of Cell Biology*, 175(3), 453–463.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–22.
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassylyev, D. G. (2004). Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, 118(3), 297–309.
- Pereira, Y., Chambert, R., Leloup, L., Daguer, J. P., & Petit-Glatron, M. F. (2001). Transcripts of the genes *sacB*, *amyE*, *sacC* and *csn* expressed in *Bacillus subtilis* under the control of the 5' untranslated *sacR* region display different stabilities that can be modulated. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 5), 1331–41.
- Petrone, B. L., Stringer, A. M., & Wade, J. T. (2014). Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of*



- Bacteriology*, 196(5), 1094–101.
- Pizarro-Cerdá, J., & Tedin, K. (2004). The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Molecular Microbiology*, 52(6), 1827–1844.
- Potrykus, K., Murphy, H., Chen, X., Epstein, J. A., & Cashel, M. (2010). Imprecise transcription termination within *Escherichia coli* *greA* leader gives rise to an array of short transcripts, GraL. *Nucleic Acids Research*, 38(5), 1636–51.
- Potrykus, K., Vinella, D., Murphy, H., Szalewska-Palasz, A., D'Ari, R., & Cashel, M. (2006). Antagonistic regulation of *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter activity by GreA and DksA. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15238–48.
- Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., & Barry, C. E. (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4889–98.
- Rakeman, J. L., Bonifield, H. R., & Miller, S. I. (1999). A HilA-independent pathway to *Salmonella typhimurium* invasion gene transcription. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3096–104.
- Ramachandran, V. K., Shearer, N., Jacob, J. J., Sharma, C. M., & Thompson, A. (2012). The architecture and ppGpp-dependent expression of the primary transcriptome of *Salmonella Typhimurium* during invasion gene expression. *BMC Genomics*, 13(1), 25.
- Reppas, N. B., Wade, J. T., Church, G. M., & Struhl, K. (2006). The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Molecular Cell*, 24(5), 747–57.
- Rhodes, M. W., & Kator, H. I. (1991). Use of *Salmonella typhimurium* WG49 to enumerate male-specific coliphages in an estuary and watershed subject to nonpoint pollution. *Water Res* 25: 1315-1323.
- Rhodijs, V. A., Suh, W. C., Nonaka, G., West, J., & Gross, C. A. (2006). Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biology*, 4(1).
- Roberts, J. W., Shankar, S., & Filter, J. J. (2008). RNA polymerase elongation factors. *Annual Review of Microbiology*, 62, 211–33.
- Roghanian, M., Yuzenkova, Y., & Zenkin, N. (2011). Controlled interplay between

- trigger loop and Gre factor in the RNA polymerase active centre. *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4352–9.
- Roghanian, M., Zenkin, N., & Yuzenkova, Y. (2015). Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1529–36.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 722–31.
- Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., & Tschäpe, H. (2003). Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 293(4), 273–85.
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 77(1), 1–52.
- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., & Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36(1), 10–23.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249–64.
- Rotger, R., & Casadesús, J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2(3), 177–84.
- Rutherford, S. T., Lemke, J. J., Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., & Gourse, R. L. (2007). Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 366(4), 1243–57.
- Rutherford, S. T., Villers, C. L., Lee, J.-H., Ross, W., & Gourse, R. L. (2009). Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes & Development*, 23(2), 236–48.

- Saini, S., Brown, J. D., Aldridge, P. D., & Rao, C. V. (2008). FliZ Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagellar gene expression. *Journal of Bacteriology*, *190*(14), 4979–88.
- Saini, S., Pearl, J. A., & Rao, C. V. (2009). Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type I fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *191*(9), 3003–10.
- Saini, S., Slauch, J. M., Aldridge, P. D., & Rao, C. V. (2010). Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes. *Journal of Bacteriology*, *192*(21), 5767–77.
- Sambanthamoorthy, K., Sloup, R. E., Parashar, V., Smith, J. M., Kim, E. E., Semmelhack, M. F., Waters, C. M. (2012). Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(10), 5202–11.
- Sands, M. K., & Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *63*(4), 505–11.
- Santangelo, T. J., & Artsimovitch, I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(5), 319–329.
- Santos, R. L., Raffatellu, M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tükel, C., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2009). Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology*, *17*(11), 498–506.
- Santos, R. L., Tsolis, R. M., Bäumler, A. J., Smith, R., & Adams, L. G. (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early *sipB*-dependent and delayed *sipB*-independent mechanisms. *Infection and Immunity*, *69*(4), 2293–301.
- Schechter, L. M., Damrauer, S. M., & Lee, C. A. (1999). Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Molecular Microbiology*, *32*(3), 629–42.
- Schechter, L. M., & Lee, C. A. (2001). AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Molecular Microbiology*, *40*(6), 1289–99.
- Schlumberger, M. C., Käppeli, R., Wetter, M., Müller, A. J., Misselwitz, B., Dilling,

- S., ... Hardt, W.-D. (2007). Two newly identified SipA domains (F1, F2) steer effector protein localization and contribute to *Salmonella* host cell manipulation. *Molecular Microbiology*, 65(3), 741–60.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., & Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4774–81.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14–56.
- Schmieger, H. (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular & General Genetics : MGG*, 119(1), 75–88.
- Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., O'Brien, A. D. (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. *Infection and Immunity*, 69(9), 5619–25.
- Shaeviz, J. W., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., & Block, S. M. (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, 426(6967), 684–7.
- Sharma, A. K., & Payne, S. M. (2006). Induction of expression of hfq by DksA is essential for *Shigella flexneri* virulence. *Molecular Microbiology*, 62(2), 469–79.
- Sherburne, C. K., Lawley, T. D., Gilmour, M. W., Blattner, F. R., Burland, V., Grotbeck, E., Taylor, D. E. (2000). The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Research*, 28(10), 2177–86.
- Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Guyon, S. Le, Römling, U., Le Guyon, S., & Römling, U. (2014). Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Microbiology*, 9(11), 1261–82.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtze, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility

- to motility. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1123–34.
- Singer, H. M., Kühne, C., Deditius, J. A., Hughes, K. T., & Erhardt, M. (2014). The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1448–57.
- Singh, V. K., Jayaswal, R. K., & Wilkinson, B. J. (2001). Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 79–84.
- Sirard, J. C., Niedergang, F., & Kraehenbuhl, J. P. (1999). Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunological Reviews*, 171, 5–26.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C. M., Rolle, K., Binnewies, T. T., Vogel, J. (2008). Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genetics*, 4(8).
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., & Vogel, J. (2007). The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 63(1), 193–217.
- Skovierova, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Lewis, C., Roberts, M., & Kormanec, J. (2006). Identification of the sigmaE regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 5), 1347–59.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3, Article3.
- Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Lasa, I. (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 7997–8002.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., & Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793–808.

- Song, M., Kim, H.-J., Kim, E. Y., Shin, M., Lee, H. C., Hong, Y., Choy, H. E. (2004). ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34183–90.
- Song, M., Kim, H.-J., Ryu, S., Yoon, H., Yun, J., & Choy, H. E. (2010). ppGpp-mediated stationary phase induction of the genes encoded by horizontally acquired pathogenicity islands and *cob/pdu* locus in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(1), 89–95.
- Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., & Goldfarb, A. (2003). Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 22(9), 2234–44.
- Sparkowski, J., & Das, A. (1990). The nucleotide sequence of greA, a suppressor gene that restores growth of an *Escherichia coli* RNA polymerase mutant at high temperature. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6443.
- Stebbins, C. E., Borukhov, S., Orlova, M., Polyakov, A., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (1995). Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*. *Nature*, 373(6515), 636–40.
- Stebbins, C. E., & Galán, J. E. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Molecular Cell*, 6(6), 1449–60.
- Steenackers, Hans, Kim Hermans, Jos Vanderleyden, S. C. J. D. K. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45, 502–531.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., & Hardt, W. D. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Molecular Microbiology*, 36(6), 1206–21.
- Stent, G. S., & Brenner, S. (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 2005–14.
- Stepanova, E., Lee, J., Ozerova, M., Semenova, E., Datsenko, K., Wanner, B. L., Borukhov, S. (2007). Analysis of promoter targets for *Escherichia coli* transcription elongation factor GreA *in vivo* and *in vitro*. *Journal of*

- Bacteriology*, 189(24), 8772–85.
- Stepanova, E. V., Shevelev, A. B., Borukhov, S. I., & Severinov, K. V. (2009). [Mechanisms of action of RNA polymerase-binding transcription factors that do not bind to DNA]. *Biofizika*, 54(5), 773–90.
- Susa, M., Kubori, T., & Shimamoto, N. (2006). A pathway branching in transcription initiation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1807–17.
- Symersky, J., Perederina, A., Vassylyeva, M. N., Svetlov, V., Artsimovitch, I., & Vassylyev, D. G. (2006). Regulation through the RNA polymerase secondary channel. Structural and functional variability of the coiled-coil transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1309–12.
- Taylor, C. M., Beresford, M., Epton, H. A. S., Sigeo, D. C., Shama, G., Andrew, P. W., & Roberts, I. S. (2002). *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 621–8.
- Tezcan-Merdol D, Engstrand L, and Rhen, M. (2005). SpvB-mediated ADP-ribosylation as an activator for host cell actin degradation. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(4), 201–212.
- Thijs, I. M. V, De Keersmaecker, S. C. J., Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., Vanderleyden, J. (2007). Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4587–4596.
- Thompson, A., Rolfe, M. D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J. C. D., & Tedin, K. (2006). The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 30112–21.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 521–4.
- Torreblanca, J., & Casadesús, J. (1996). DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* and a novel *dam*-regulated locus. *Genetics*, 144(1), 15–26.
- Torrieri, R., Oliveira, F. S., Oliveira, G., & Coimbra, R. S. (2012). Automatic

- Assignment of Prokaryotic Genes to Functional Categories Using Literature Profiling. *PLoS ONE*, 7(10).
- Toulokhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., & Landick, R. (2007). A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing. *Molecular Cell*, 27(3), 406–19.
- Trautinger, B. W., & Lloyd, R. G. (2002). Modulation of DNA repair by mutations flanking the DNA channel through RNA polymerase. *The EMBO Journal*, 21(24), 6944–53.
- Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G., & Bäumler, A. J. (1999). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 67(12), 6385–93.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15264–9.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Boucher, C. (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology*, 15(6), 1095–114.
- Van Immerseel, F., Eeckhaut, V., Boyen, F., Pasmans, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2008). Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hilA*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(3), 455–61.
- Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, A. M., Virlogeux-Payant, I. (2012). Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 243–58.
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Ballance, S., Langsrud, S., & Nesse, L. L. (2009). Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. *BMC Veterinary Research*, 5, 43.
- Vinella, D., Potrykus, K., Murphy, H., & Cashel, M. (2012). Effects on growth by changes of the balance between GreA, GreB, and DksA suggest mutual



- competition and functional redundancy in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 261–73.
- Vivero, A., Baños, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., García-del Portillo, F., Juárez, A., & Madrid, C. (2008). Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1152–6.
- Wada, T., Morizane, T., Abo, T., Tominaga, A., Inoue-Tanaka, K., & Kutsukake, K. (2011). EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 193(7), 1600–11.
- Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 17–34.
- Wall, D. M., Nadeau, W. J., Pazos, M. A., Shi, H. N., Galyov, E. E., & McCormick, B. A. (2007). Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2299–313.
- Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36(5), 997–1005.
- Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C., & Kenney, L. J. (2007). The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Molecular Microbiology*, 65(2), 477–93.
- Warawa, J., Finlay, B. B., & Kenny, B. (1999). Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5538–40.
- White, A. P., Gibson, D. L., Grassl, G. A., Kay, W. W., Finlay, B. B., Vallance, B. A., & Surette, M. G. (2008). Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 76(3), 1048–58.
- Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular Microbiology*, 29(3), 883–91.
- Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Siber, A. M., McCormick, B. A.,

- Hedges, S., Galyov, E. E. (2000). The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cellular Microbiology*, 2(4), 293–303.
- Worley, M. J., Ching, K. H., & Heffron, F. (2000). *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular Microbiology*, 36(3), 749–61.
- Wu, H., Jones, R. M., & Neish, A. S. (2012). The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. *Cellular Microbiology*, 14(1), 28–39.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103–19.
- Yoon, H., McDermott, J. E., Porwollik, S., McClelland, M., & Heffron, F. (2009). Coordinated regulation of virulence during systemic infection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Pathogens*, 5(2).
- Yun, J., Jeon, B., Barton, Y.-W., Plummer, P., Zhang, Q., & Ryu, S. (2008). Role of the DksA-like protein in the pathogenesis and diverse metabolic activity of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4512–20.
- Yuzenkova, Y., Gamba, P., Herber, M., Attaiech, L., Shafeeq, S., Kuipers, O. P., Veening, J.-W. (2014). Control of transcription elongation by GreA determines rate of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10987–99.
- Yuzenkova, Y., & Zenkin, N. (2010). Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10878–83.
- Zakikhany, K., Harrington, C. R., Nimtz, M., Hinton, J. C. D., & Römling, U. (2010). Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 77(3), 771–86.
- Zeng, Q., McNally, R. R., & Sundin, G. W. (2013). Global small RNA chaperone Hfq and regulatory small RNAs are important virulence regulators in *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1706–17.
- Zengel, J. M., Sha, Y., & Lindahl, L. (2002). Surprising flexibility of leader RNA determinants for r-protein L4-mediated transcription termination in the

- Escherichia coli* S10 operon. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(5), 572–8.
- Zenkin, N., Yuzenkova, Y., & Severinov, K. (2006). Transcript-assisted transcriptional proofreading. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5786), 518–20.
- Zhang, S., Santos, R. L., Tsolis, R. M., Stender, S., Hardt, W.-D., Bäumler, A. J., & Adams, L. G. (2002). The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity*, 70(7), 3843–55.
- Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to “foraging”-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4441–52.
- Zhao, T., Zhao, P., Cannon, J. L., & Doyle, M. P. (2011). Inactivation of *Salmonella* in biofilms and on chicken cages and preharvest poultry by levulinic Acid and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Food Protection*, 74(12), 2024–30.
- Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., & Galán, J. E. (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Molecular Microbiology*, 39(2), 248–259.
- Zhou, D., Mooseker, M. S., & Galán, J. E. (1999). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5410), 2092–5.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452–63.
- Zorraquino, V., García, B., Latasa, C., Echeverez, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C. (2013). Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 417–28.
- Zusman, T., Gal-Mor, O., & Segal, G. (2002). Characterization of a *Legionella pneumophila relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 67–75.

## **8. ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### TABLAS SUPLEMENTARIAS

#### **Tabla suplementaria 1 (material suplementario en USB)**

Diferencia de expresión de todos los genes de SV5015 en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, respecto a la cepa WT. En gris claro se indican los genes estimulados y en gris oscuro los genes reprimidos por los factores Gre considerando un FC entre 2 y -2.

#### **Tabla suplementaria 2 (material suplementario en USB)**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB* respecto a la cepa WT. En gris claro se indican los genes estimulados y en gris oscuro los genes reprimidos por los factores Gre considerando un FC entre 2 y -2.

#### **Tabla suplementaria 3 (material anexo)**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB* respecto a la cepa WT, organizados por categorías funcionales. En gris claro se indican los genes estimulados y en gris oscuro los genes reprimidos por los factores Gre considerando un FC entre 2 y -2.

#### **Tabla suplementaria 4 (material anexo)**

Genes de la categoría HGT afectados en las mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*. En gris claro se indican los genes estimulados y en gris oscuro los genes reprimidos por los factores Gre considerando un FC entre 2 y -2.

#### **Tabla suplementaria 5 (material suplementario en USB)**

Genes afectados en las cepas mutantes *dksA* y *greAgreB*, respecto a la cepa WT. En gris claro se indican los genes estimulados y en gris oscuro los genes reprimidos por los factores Gre y/o la proteína DksA considerando un FC entre 2 y -2.



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Amino acid biosynthesis</b>					
SL0002	<i>thrA</i>	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1	1,70	1,02	2,42
SL0110	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 1	1,18	-1,08	2,28
SL0111	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit 1	1,24	1,05	3,98
SL0112	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	1,21	-1,08	3,10
SL0115	<i>leuO</i>	Probable HTH-type transcriptional regulator leuO	-1,27	1,23	-2,01
SL0511	<i>gip</i>	Hydroxypyruvate isomerase	1,41	-1,11	10,16
SL0560	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase frlB	1,61	1,34	2,73
SL1040	<i>hpaG</i>	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	-1,05	-1,11	7,56
SL1238	<i>astC</i>	Succinylornithine transaminase	-1,30	-1,41	43,62
SL1292	<i>aroD</i>	3-dehydroquinate dehydratase	1,21	1,04	2,37
SL1293	<i>ydiB</i>	Quinate/shikimate dehydrogenase	-1,06	-1,22	2,17
SL1723	<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase	1,13	-1,42	17,53
SL1779	<i>yebU</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	1,12	1,03	-2,70
SL2049	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	1,16	-1,09	3,14
SL2050	<i>hisC</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase	1,27	1,00	3,41
SL2053	<i>hisA</i>	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	1,22	-1,18	2,60
SL2054	<i>hisF</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	1,31	-1,03	2,74
SL2055	<i>hisI</i>	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisIE	1,21	-1,08	2,06
SL2393	<i>cysK</i>	Cysteine synthase A	1,11	1,01	2,16
SL2625	<i>pheA</i>	P-protein	1,11	-1,21	2,88
SL3165	-	Arylsulfotransferase	-1,13	-1,15	3,35
SL3166	<i>dsbA</i>	Thiol:disulfide interchange protein dsbA	-1,19	-1,13	3,06
SL3303	<i>gltD</i>	Glutamate synthase [NADPH] small chain	1,26	1,03	2,37
SL3498	<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	1,02	1,08	3,10
SL3566	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase frlB	1,36	-1,39	33,98
SL3761	<i>ilvN</i>	Acetolactate synthase isozyme 1 small subunit	1,53	1,09	4,96
SL3762	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit	1,51	1,08	5,91
SL3861	<i>ilvG</i>	Acetolactate synthase isozyme 2 large subunit	-1,19	1,08	3,17
SL3862	<i>ilvM</i>	Acetolactate synthase isozyme 2 small subunit	-1,01	1,08	5,19
SL3865	<i>ilvA</i>	Threonine dehydratase biosynthetic	1,35	-1,06	2,36
SL3969	<i>yihU</i>	Uncharacterized oxidoreductase yihU	1,17	-1,17	6,23
SL4047	-	Arylsulfate Sulfotransferase	1,05	-1,06	2,61
SL4055	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	-1,37	1,02	-3,35
SL4078	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	1,06	1,07	-1,99
SL4393	<i>argR</i>	Arginine repressor	2,49	1,35	-1,35
SL4430	<i>yjhP</i>	Uncharacterized protein yjhP	1,27	1,18	2,26
SL4471	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase frlB	2,57	1,34	14,58
SL4510	<i>trpR</i>	Trp operon repressor	1,10	-1,25	2,05
<b>Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers</b>					
SL0008	<i>mog</i>	Molybdopterin adenylyltransferase	1,33	1,02	2,27



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers</b>					
SL0164	<i>pdxA2</i>	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase 2	1,36	1,07	2,76
SL0221	<i>dxr</i>	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	-1,00	-1,05	-2,21
SL0222	<i>uppS</i>	Undecaprenyl pyrophosphate synthase	-1,06	1,22	-2,18
SL0433	<i>cyoE</i>	Protoheme IX farnesyltransferase	-1,12	-1,50	11,62
SL0482	<i>hemH</i>	Ferrochelataze	1,04	-1,00	-8,01
SL0585	<i>entB</i>	Isochorismatase	1,10	1,23	2,00
SL0586	<i>entA</i>	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	1,11	-1,28	2,33
SL0771	<i>bioB</i>	Biotin synthase	-1,22	-1,11	2,06
SL0780	<i>moaC</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C	1,17	1,08	2,26
SL0781	<i>moaD</i>	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	1,13	1,02	2,25
SL0782	<i>moaE</i>	Molybdopterin synthase catalytic subunit	1,38	1,21	2,41
SL1102	<i>grxB</i>	Glutaredoxin-2	1,21	1,37	2,26
SL1120	<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein 1	-1,10	1,09	-2,64
SL1380	<i>pdxH</i>	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	1,10	1,04	-2,30
SL1528	<i>ydcW</i>	Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	1,09	1,11	2,33
SL1650	<i>btuR</i>	Cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	1,19	-1,12	2,90
SL1703	<i>hemK</i>	Protein methyltransferase hemK	1,30	-1,09	-2,25
SL1779	<i>yebU</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	1,12	1,03	-2,70
SL1859	<i>flhC</i>	Flagellar transcriptional activator flhC	-1,22	1,15	-3,09
SL2170	<i>folE</i>	GTP cyclohydrolase 1	1,10	1,04	-3,82
SL2265	<i>ais</i>	Lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase	-1,34	1,08	-4,74
SL2339	<i>pdxB</i>	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	-1,02	-1,07	-2,04
SL2505	<i>iscS</i>	Cysteine desulfurase	-1,17	1,13	-1,99
SL2928	<i>queD</i>	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase	-1,10	1,06	-2,01
SL3179	<i>folB</i>	Dihydroneopterin aldolase	-1,39	-1,02	-2,66
SL3969	<i>yihU</i>	Uncharacterized oxidoreductase yihU	1,17	-1,17	6,23
SL4039	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	1,07	-1,01	-2,24
SL4078	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	1,06	1,07	-1,99
SL4098	<i>thiH</i>	Dehydroglycine synthase	1,23	1,13	3,47
SL4099	<i>thiG</i>	Thiazole synthase	1,42	1,35	4,86
SL4100	<i>thiS</i>	Sulfur carrier protein ThiS	1,69	1,23	3,53
SL4101	<i>thiF</i>	Sulfur carrier protein ThiS adenylyltransferase	1,43	-1,04	4,02
SL4102	<i>thiE</i>	Thiamine-phosphate pyrophosphorylase	1,31	-1,10	3,49
SL4103	<i>thiC</i>	Phosphomethylpyrimidine synthase	1,36	1,01	3,16
SL4170	<i>ubiC</i>	Chorismate--pyruvate lyase	1,29	1,13	2,11
SL4430	<i>yjhP</i>	Uncharacterized protein yjhP	1,27	1,18	2,26
<b>Cell envelope</b>					
SL0012	<i>dnaK</i>	Chaperone protein dnaK	1,05	1,13	2,97
SL0064	<i>citG1</i>	Probable 2-(5''-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase 1	1,12	1,15	2,58
SL0143	<i>hofB</i>	Protein transport protein hofB	-1,00	-1,08	2,18
SL0163	<i>ygbK</i>	Uncharacterized protein HI_1011	1,23	-1,06	4,11

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Cell envelope</b>					
SL0192	<i>fhuA</i>	Ferrichrome-iron receptor	-1,04	1,41	-2,51
SL0196	<i>stfA</i>	Fimbria A protein	1,28	-1,06	3,38
SL0315	<i>crl</i>	Sigma factor-binding protein <i>crl</i>	1,19	1,17	2,15
SL0336	-	Transmembrane Regulator	-1,37	-1,27	-3,98
SL0344	<i>yjel</i>	Uncharacterized protein <i>yjel</i>	1,27	1,26	3,73
SL0316	<i>phoE</i>	Outer membrane pore protein E	1,24	1,23	2,05
SL0376	-	Extensin Family Protein	1,14	1,21	4,71
SL0419	<i>thil</i>	tRNA sulfurtransferase	1,08	-1,05	-2,71
SL0432	<i>ybeT</i>	Hypothetical	-1,10	-1,28	2,29
SL0502	-	Outer Membrane Protein	1,25	-1,12	2,30
SL0533	<i>ybcI</i>	Inner membrane protein <i>ybcI</i>	-1,08	1,05	-2,95
SL0536	<i>fimA</i>	Fimbrial subunit type 1	-1,80	1,10	-9,56
SL0538	<i>fimC</i>	Chaperone protein <i>fimC</i>	-2,52	-1,37	-22,44
SL0548	<i>yfdH</i>	Bactoprenol glucosyl transferase homolog from prophage CPS-53	-1,04	-1,04	-1,99
SL0549	<i>gtrA</i>	Bactoprenol-linked glucose translocase homolog from prophage CPS-53	1,09	-1,03	-2,84
SL0554	<i>ykgB</i>	Inner membrane protein <i>ykgB</i>	-1,12	1,08	2,01
SL0560	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase <i>frlB</i>	1,61	1,34	2,73
SL0625	<i>dacA</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase <i>dacA</i>	-1,04	1,03	-2,41
SL0644	<i>ybeS</i>	putative molecular chaperone, DnaJ family	-1,25	-1,33	1,98
SL0729	<i>tolA</i>	Protein <i>tolA</i>	1,01	1,18	-2,07
SL0839	<i>dacC</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase <i>dacC</i>	1,07	1,23	2,58
SL0936	<i>ompF</i>	Outer membrane protein F	-1,25	-1,04	7,42
SL1014	<i>yccF</i>	Inner membrane protein <i>yccF</i>	1,04	-1,03	-2,33
SL1019	<i>yccV</i>	putative inner membrane protein	1,14	1,34	2,80
SL1069	<i>yiiY</i>	Uncharacterized protein <i>yiiY</i>	-1,43	-1,50	5,40
SL1077	<i>csgF</i>	Curli production assembly/transport component <i>csgF</i>	1,01	1,13	2,00
SL1089	<i>yceK</i>	Uncharacterized protein <i>yceK</i>	1,14	1,08	2,17
SL1092	<i>htrB</i>	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	-1,04	-1,13	-2,37
SL1115	<i>flgF</i>	Flagellar basal-body rod protein <i>flgF</i>	1,06	-1,01	2,09
SL1179	<i>envF</i>	Probable lipoprotein <i>envF</i>	-1,32	1,19	-2,17
SL1181	<i>envE</i>	Probable lipoprotein <i>envE</i>	-1,28	1,13	-3,82
SL1192	<i>dppB</i>	Putative peptide transport system permease protein BMEII0209	1,22	-1,42	2,88
SL1263	-	Hypothetical	-1,90	-1,40	-12,64
SL1264	-	DNA/RNA Non-Specific Endonuclease	-2,17	1,18	-7,63
SL1266	<i>rfc</i>	O-antigen polymerase	-1,22	1,02	-2,41
SL1364	<i>ydhO</i>	Uncharacterized protein <i>ydhO</i>	-1,19	1,04	-2,16
SL1404	<i>ompN</i>	Outer membrane protein N	-1,25	1,15	2,01
SL1425	<i>dmsD</i>	Twin-arginine leader-binding protein <i>dmsD</i>	1,18	-1,01	-2,00
SL1459	<i>ompC</i>	Outer membrane protein C	-1,17	1,00	2,18
SL1489	<i>treY</i>	Maltooligosyl trehalose synthase	1,42	1,24	3,14
SL1525	<i>srfB</i>	Virulence Protein <i>SrfB</i>	1,49	-1,02	4,34
SL1537	<i>ydcl</i>	Uncharacterized lipoprotein <i>ydcl</i>	1,44	-1,04	2,52

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Cell envelope</b>					
SL1562	-	Hypothetical	-1,22	1,44	-2,15
SL1567	-	Hypothetical	-1,43	1,20	-1,98
SL1593	<i>ynaJ</i>	Uncharacterized protein ynaJ	1,25	1,00	2,94
SL1628	<i>steC</i>	Secreted effector kinase steC	-5,23	1,46	-2,62
SL1640	<i>yciM</i>	Uncharacterized protein yciM	-1,08	1,06	-2,25
SL1678	-	Hypothetical	-1,01	1,01	1,98
SL1710	<i>ychH</i>	Uncharacterized protein ychH	1,38	1,30	3,18
SL1726	<i>ycgR</i>	Flagellar brake protein YcgR	-1,35	1,14	-5,01
SL1727	<i>emtA</i>	Endo-type membrane-bound lytic murein transglycosylase A	1,00	1,06	-2,10
SL1730	<i>dadX</i>	Alanine racemase, catabolic	-1,27	-1,83	6,94
SL1735	<i>dsbB</i>	Disulfide bond formation protein B	1,07	-1,14	-2,28
SL1748	<i>yeaY</i>	Uncharacterized lipoprotein yeaY	-1,02	1,19	-2,20
SL1769	<i>mgrB</i>	Protein mgrB	1,02	1,21	-3,11
SL1783	-	Hypothetical	-1,31	1,41	-8,58
SL1794	-	Hypothetical	-2,21	1,11	-7,65
SL1795	-	Hypothetical	-1,97	1,32	-5,78
SL1860	<i>flhD</i>	Transcriptional activator FlhD	-1,28	1,09	-3,17
SL1874	-	Hypothetical	-1,90	1,19	-4,78
SL1911	<i>rcaA</i>	Colanic acid capsular biosynthesis activation protein A	-1,16	1,36	-2,52
SL1922	<i>yedR</i>	Inner membrane protein yedR	1,03	1,36	-4,09
SL1923	<i>ompS1</i>	Outer membrane protein S1	1,31	1,22	2,32
SL2038	<i>dacD</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase dacD	1,14	-1,00	-3,59
SL2056	<i>wzzB</i>	Chain length determinant protein	-1,51	1,00	-6,76
SL2077	<i>wcaL</i>	Putative colanic acid biosynthesis glycosyltransferase wcaL	1,29	-1,03	3,22
SL2115	-	Hypothetical	-4,46	1,33	-2,96
SL2128	<i>yehC</i>	Uncharacterized fimbrial chaperone yehC	1,00	-1,17	-2,06
SL2191	<i>spr</i>	Lipoprotein spr	-1,35	1,17	-3,81
SL2221	-	Conserved Hypothetical Protein	-2,49	1,39	-2,04
SL2267	<i>arnC</i>	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	-1,49	-1,03	-2,05
SL2272	<i>arnF</i>	Probable 4-amino-4-deoxy-L-arabinose-phosphoundecaprenol flippase subunit ArnF	-1,17	1,24	-2,31
SL2308	<i>yfcC</i>	Uncharacterized protein yfcC	1,14	-1,21	-2,45
SL2369	<i>ddg</i>	Protein ddg	-1,46	-1,05	-11,56
SL2467	-	Hypothetical	-1,23	-1,01	-3,33
SL2468	<i>yfgG</i>	Uncharacterized protein yfgG	1,01	1,01	-3,19
SL2478	<i>sinI</i>	Outer Membrane Protein	1,21	1,13	2,39
SL2623	<i>yfiO</i>	UPF0169 lipoprotein yfiO	-1,30	-1,33	-2,41
SL2756	<i>fljB</i>	Phase 2 flagellin	-2,40	-1,63	-1,84
SL2784	<i>ygaW</i>	Uncharacterized protein ygaW	1,29	1,21	-3,82
SL2893	<i>rffG</i>	Uncharacterized protein HI_1014	1,10	1,17	4,43
SL2896	<i>ygbK</i>	Uncharacterized protein ygbK	-1,09	1,24	7,13
SL2911	<i>ygbE</i>	Inner membrane protein ygbE	-1,18	1,12	2,47

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Cell envelope</b>					
SL2961	<i>ugdD</i>	UPF0382 inner membrane protein ugdD	-1,18	-1,02	-2,47
SL2969	<i>amiC</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC	-1,05	1,02	-1,99
SL2999	-	Hypothetical	1,97	1,21	-2,88
SL3167	<i>dsbB</i>	Putative protein-disulfide oxidoreductase	-1,31	-1,22	3,38
SL3322	<i>citG1</i>	Probable 2-(5"-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase 1	1,39	1,09	2,38
SL3363	<i>acrE</i>	Acriflavine resistance protein E	1,26	1,10	-2,58
SL3468	<i>envZ</i>	Osmolarity sensor protein envZ	-1,07	-1,61	-2,23
SL3515	-	Hypothetical	-1,08	-1,01	-2,67
SL3566	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase frlB	1,36	-1,39	33,98
SL3569	-	Hypothetical	1,19	1,25	3,95
SL3689	<i>rfaQ</i>	Lipopolysaccharide core heptosyltransferase rfaQ	-1,02	-1,01	-2,00
SL3969	<i>yihU</i>	Uncharacterized oxidoreductase yihU	1,17	-1,17	6,23
SL3989	-	Hypothetical	1,02	1,17	-2,15
SL4075	<i>sthA</i>	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	-1,05	-1,16	2,56
SL4159	<i>yjbF</i>	Uncharacterized lipoprotein yjbF	-1,15	1,05	-2,28
SL4207	<i>cidA</i>	Holin-like protein cidA	-1,10	-1,01	-19,38
SL4208	<i>ywbG</i>	Uncharacterized protein ywbG	-1,18	-1,29	-19,43
SL4247	<i>yjiK</i>	Uncharacterized protein yjiK	-1,74	1,10	-24,46
SL4267	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	1,17	-1,02	2,58
SL4312	<i>bsmA</i>	Lipoprotein BsmA	1,31	1,21	5,00
SL4333	<i>ytfF</i>	Inner membrane protein ytfF	1,15	1,22	2,16
SL4373	-	Hypothetical	1,09	1,02	2,64
SL4374	-	Hypothetical	1,13	1,07	2,36
SL4394	<i>yfcC</i>	Uncharacterized protein HI_0594	2,59	1,62	-1,71
SL4402	<i>ytgA</i>	Uncharacterized protein ytgA	1,31	-1,20	2,30
SL4435	-	Hypothetical	-1,43	1,10	-2,04
SL4459	-	Hypothetical	1,29	1,33	2,48
SL4471	<i>frlB</i>	Fructosamine deglycase frlB	2,57	1,34	14,58
SL4509	<i>slt</i>	Soluble lytic murein transglycosylase	1,26	-1,04	2,00
<b>Cellular processes</b>					
SL0178	<i>fimF</i>	Fimbrial subunit type 1	1,05	-1,03	3,27
SL0377	<i>mdtG</i>	Multidrug resistance protein mdtG	1,08	-1,08	-2,63
SL0397	<i>ahpC</i>	Probable peroxiredoxin	-1,02	1,14	-2,76
SL0537	<i>fimI</i>	Putative fimbrin-like protein fimI	-2,48	-1,26	-17,41
SL0539	<i>fimD</i>	Outer membrane usher protein fimD	-1,99	-1,09	-5,31
SL0540	<i>fimH</i>	Protein fimH	-1,50	-1,09	-2,74
SL0542	<i>fimZ</i>	Fimbriae Z protein	-1,27	1,09	-2,40
SL0543	<i>fimY</i>	Fimbriae Y protein	1,43	1,29	-2,23
SL0596	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1,12	1,10	-2,32
SL0597	<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	-1,10	-1,02	-2,42
SL0617	<i>cspE</i>	Cold shock-like protein cspE	-1,33	1,02	-2,78
SL0931	<i>mukB</i>	Chromosome partition protein mukB	1,03	1,14	2,29
SL1106	<i>mviM</i>	Virulence factor mviM	1,26	1,13	2,46
SL1110	<i>flgA</i>	Flagella basal body P-ring formation protein flgA	1,52	1,11	3,45

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Cellular processes</b>					
SL1116	<i>flgG</i>	Flagellar basal-body rod protein flgG	1,03	1,01	2,14
SL1120	<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein 1	-1,10	1,09	-2,64
SL1184	<i>pagC</i>	Virulence membrane protein pagC	-2,42	1,32	-11,99
SL1376	<i>slyA</i>	Transcriptional regulator slyA	-1,20	1,17	-2,26
SL1383	<i>gst</i>	Glutathione S-transferase	1,30	1,18	2,14
SL1553	<i>pnbA</i>	Para-nitrobenzyl esterase	1,36	-1,32	3,07
SL1578	<i>hslJ</i>	Heat shock protein hslJ	1,22	1,18	-2,04
SL1582	<i>uspF</i>	Universal stress protein F	1,10	1,34	2,66
SL1592	<i>uspE</i>	Universal stress protein E	1,17	1,34	2,28
SL1612	<i>tpx</i>	Probable thiol peroxidase	-1,28	-1,22	2,53
SL1617	<i>pspD</i>	Phage shock protein D	-1,19	1,34	-2,02
SL1619	<i>pspB</i>	Phage shock protein B	-1,15	1,34	-2,10
SL1621	<i>pspF</i>	Psp operon transcriptional activator	1,09	-1,00	2,78
SL1637	<i>osmB</i>	Osmotically-inducible lipoprotein B	-1,30	1,02	-4,73
SL1666	<i>ispZ</i>	Probable intracellular septation protein	-1,19	-1,16	-2,06
SL1696	<i>ychO</i>	Uncharacterized protein ychO	-1,07	-1,09	-2,00
SL1724	<i>treA</i>	Periplasmic trehalase	1,22	1,12	2,95
SL1742	<i>minC</i>	Probable septum site-determining protein minC	-1,29	-1,16	-4,10
SL1850	<i>cheZ</i>	Chemotaxis protein cheZ	-1,01	1,09	-2,12
SL1851	<i>cheY</i>	Chemotaxis protein cheY	-1,01	1,11	-2,17
SL1852	<i>cheB</i>	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	-1,12	1,10	-3,86
SL1853	<i>cheR</i>	Chemotaxis protein methyltransferase	-1,24	1,07	-3,83
SL1854	<i>tar</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein II	-1,20	1,07	-2,19
SL1857	<i>motB</i>	Motility protein B	-1,29	1,06	-2,99
SL1858	<i>motA</i>	Motility protein A	-1,20	1,23	-3,31
SL1859	<i>flhC</i>	Flagellar transcriptional activator flhC	-1,22	1,15	-3,09
SL1879	<i>sdiA</i>	Regulatory protein sdiA	-1,09	1,23	-3,85
SL1889	<i>fliD</i>	Flagellar hook-associated protein 2	-1,07	1,01	-2,40
SL1890	<i>fliS</i>	Flagellar protein fliS	-1,30	-1,22	-3,14
SL1891	<i>fliT</i>	Flagellar protein fliT	-1,26	-1,14	-3,00
SL1902	<i>fliJ</i>	Flagellar fliJ protein	1,20	1,30	2,04
SL1924	<i>cspB</i>	Cold shock-like protein cspB	-1,53	-1,31	-2,11
SL2214	<i>pifA</i>	KAP P-Loop Domain-Containing Protein	-1,29	-1,52	2,07
SL2220	-	Homolog Of Virulence Protein MsgA	-1,66	1,18	-2,64
SL2265	<i>ais</i>	Lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase	-1,34	1,08	-4,74
SL2266	<i>arnB</i>	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose--oxoglutarate aminotransferase	-1,29	1,15	-2,44
SL2283	<i>cheV</i>	Chemotaxis protein cheV	-1,26	-1,24	-10,75
SL2495	<i>sseA</i>	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	1,08	1,25	2,90
SL2542	<i>era</i>	GTP-binding protein era homolog	-1,00	-1,09	-2,18
SL2652	<i>corB</i>	putative membrane protein	-1,25	-1,36	-2,50
SL2755	<i>fljA</i>	Repressor of phase 1 flagellin gene	-12,65	-4,66	-15,85
SL2899	<i>slyA</i>	Transcriptional regulator	-1,10	1,09	2,00
SL2929	-	Uncharacterized protein MJ0301	1,10	1,29	2,23

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Cellular processes</b>					
SL3051	<i>cbiO</i>	Cobalt import ATP-binding protein CbiO	1,32	-1,15	2,12
SL3112	<i>bdIA</i>	Biofilm dispersion protein BdlA	-1,33	-1,01	-3,40
SL3126	<i>tse</i>	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	-1,55	1,00	-8,28
SL3178	<i>bacA</i>	Undecaprenyl-diphosphatase	-1,19	-1,11	-2,21
SL3189	<i>cheM</i>	methyl-accepting chemotaxis protein II	-1,38	-1,15	-3,94
SL3313	<i>sspB</i>	Stringent starvation protein B	-1,27	-1,08	-2,06
SL3346	<i>mreB</i>	Rod shape-determining protein mreB	-1,11	1,01	-2,43
SL3437	<i>fic</i>	Probable adenosine monophosphate-protein transferase fic	1,20	1,17	2,17
SL3536	<i>ftsY</i>	Cell division protein ftsY	1,05	1,09	-2,07
SL3542	<i>tcp</i>	Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	1,12	1,11	-2,21
SL3555	<i>uspB</i>	Universal stress protein B	1,18	1,24	2,84
SL3615	<i>cspA</i>	Cold shock protein cspA	-1,20	-1,57	-2,91
SL3635	-	Hypothetical	1,09	1,12	2,38
SL3649	<i>yibF</i>	Uncharacterized GST-like protein yibF	1,10	1,09	2,65
SL3786	<i>yhjA</i>	Probable cytochrome c peroxidase	-1,07	-1,11	-2,69
SL3903	<i>xerC</i>	Tyrosine recombinase xerC	-1,10	-1,39	-2,00
SL4056	<i>katG1</i>	Catalase-peroxidase 1	1,05	1,00	-3,75
SL4248	-	Hypothetical	-2,43	-1,91	-28,20
SL4261	<i>cutA</i>	Divalent-cation tolerance protein cutA	-1,04	-1,19	-2,17
SL4340	<i>ytfL</i>	UPF0053 inner membrane protein ytfL	-1,12	-1,16	-2,96
SL4464	<i>tsr</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	-1,03	-1,00	-2,50
<b>Central intermediary metabolism</b>					
SL0036	<i>betC</i>	Choline-sulfatase	-1,04	-1,01	3,95
SL0305	<i>fadE</i>	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	-1,34	1,19	9,79
SL0510	<i>gcl</i>	Glyoxylate carboligase	1,65	-1,22	7,44
SL0511	<i>gip</i>	Hydroxypyruvate isomerase	1,41	-1,11	10,16
SL0637	-	putative hydrolase N-terminus	1,26	-1,00	-7,34
SL0683	<i>speF</i>	Ornithine decarboxylase, inducible	1,04	-1,26	-4,29
SL1041	<i>hpcC</i>	5-carboxymethyl-2-hydroxyuconate semialdehyde dehydrogenase	1,01	-1,10	7,23
SL1042	<i>hpcB</i>	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	-1,01	-1,16	6,00
SL1056	<i>agp</i>	Glucose-1-phosphatase	1,04	1,28	3,03
SL1513	<i>nhoA</i>	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase	-1,08	-1,04	-2,40
SL1779	<i>yebU</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	1,12	1,03	-2,70
SL2205	<i>yejM</i>	Inner membrane protein yejM	1,01	-1,05	-2,01
SL2463	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	1,14	1,09	-2,33
SL2537	<i>cynR</i>	HTH-type transcriptional regulator cynR	-1,02	1,05	3,05
SL2741	-	Glucose-6-Phosphate Isomerase	1,26	1,00	2,42
SL2775	<i>gabD</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	-1,31	-1,53	12,61
SL2776	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	-1,37	-1,66	7,78
SL2894	<i>ygbM</i>	Protein ygbM	-1,09	-1,22	4,27
SL2897	<i>ygbJ</i>	Uncharacterized oxidoreductase ygbJ	-1,09	1,34	6,18
SL2912	<i>cysC</i>	Adenylyl-sulfate kinase	-1,09	-1,01	9,51
SL2913	<i>cysN</i>	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	1,04	1,00	11,16
SL2914	<i>cysD</i>	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	1,00	-1,20	4,76

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Central intermediary metabolism</b>					
SL2925	<i>cysH</i>	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	1,07	-1,06	5,34
SL3065	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthase	-1,11	-1,17	-2,26
SL3516	<i>php</i>	Phosphotriesterase homology protein	1,01	-1,07	-2,76
SL4078	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	1,06	1,07	-1,99
SL4319	<i>ulaD</i>	3-keto-L-gulonate-6-phosphate decarboxylase ulaD	1,23	-1,49	3,02
SL4413	<i>idnO</i>	Gluconate 5-dehydrogenase	1,50	-1,24	3,80
<b>DNA metabolism</b>					
SL0160	-	Restriction Endonuclease	-1,11	-1,47	-2,18
SL0353	<i>res</i>	Type III restriction-modification system StyLTI enzyme res	1,14	1,07	2,64
SL0391	<i>sbcD</i>	Nuclease sbcCD subunit D	1,16	1,08	-2,20
SL0445	<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU-beta	1,17	1,14	2,02
SL1237	<i>xthA</i>	Exodeoxyribonuclease III	-1,03	-1,08	-2,28
SL1401	<i>tus</i>	DNA replication terminus site-binding protein	1,35	1,09	3,56
SL1467	<i>hupB</i>	Uptake hydrogenase large subunit	-1,17	-1,17	3,66
SL1779	<i>yebU</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	1,12	1,03	-2,70
SL1876	<i>uvrC</i>	UvrABC system protein C	1,11	-1,11	-2,18
SL2051	<i>hisB</i>	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB	1,25	-1,13	2,86
SL2473	<i>xseA</i>	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit	-1,13	-1,03	-2,01
SL2783	<i>stpA</i>	DNA-binding protein stpA	-1,14	-1,00	-10,03
SL3085	<i>mutY</i>	A/G-specific adenine glycosylase	-1,13	-1,16	-2,32
SL3098	<i>moaR</i>	Monoamine regulon transcriptional regulator	1,11	1,43	2,42
SL3184	<i>dnaG</i>	DNA primase	-1,03	1,12	-2,31
SL3358	<i>fis</i>	DNA-binding protein fis	-1,24	-1,03	-3,28
SL3598	-	Hypothetical	-1,38	-1,04	-2,34
SL3608	<i>tag</i>	DNA-3-methyladenine glycosylase 1	1,17	-1,05	2,24
SL3695	<i>yicR</i>	UPF0758 protein yicR	-1,04	1,06	3,41
SL3744	<i>yiaG</i>	Transcriptional Regulator XRE Family	1,35	1,35	3,84
SL3805	<i>dnaA</i>	Chromosomal replication initiator protein dnaA	1,02	1,07	-2,05
SL4044	<i>priA</i>	Primosomal protein N'	-1,12	1,14	-1,99
SL4078	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	1,06	1,07	-1,99
SL4174	<i>lexA</i>	LexA repressor	1,13	1,16	2,28
SL4316	<i>ulaA</i>	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	1,34	1,14	9,06
SL4359	<i>ioll</i>	Inosose isomerase	1,20	-1,01	2,12
SL4406	<i>holC</i>	DNA polymerase III subunit chi	1,13	-1,20	2,20
SL4419	-	Restriction Endonuclease	1,20	1,05	2,21
SL4430	<i>yjhP</i>	Uncharacterized protein yjhP	1,27	1,18	2,26
SL4457	<i>hsdR</i>	Type I restriction enzyme EcoKI R protein	1,09	1,02	2,34
SL4470	<i>glmS</i>	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	3,29	1,02	23,21
<b>Energy metabolism</b>					
SL0056	<i>oadA</i>	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	1,21	-1,06	2,57
SL0061	<i>citE</i>	Citrate lyase subunit beta	1,11	1,07	7,85

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL0071	<i>caiD</i>	Carnitiny-CoA dehydratase	1,28	-1,04	2,23
SL0102	<i>araA</i>	L-arabinose isomerase	1,07	-1,06	2,50
SL0103	<i>araB</i>	Ribulokinase	1,02	-1,03	3,31
SL0153	<i>aceF</i>	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	1,13	-1,02	3,97
SL0154	<i>lpdA</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1,13	-1,04	2,79
SL0159	<i>acnB</i>	Aconitate hydratase 2	1,07	-1,21	3,83
SL0255	<i>mltD</i>	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	-1,61	1,08	-6,32
SL0364	<i>prpC</i>	2-methylcitrate synthase	-1,05	1,08	5,33
SL0366	<i>prpE</i>	Propionate--CoA ligase	1,23	-1,12	4,91
SL0434	<i>cyoD</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase protein cyoD	-1,20	-1,53	13,42
SL0435	<i>cyoC</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit 3	-1,10	-1,60	13,28
SL0436	<i>cyoB</i>	Ubiquinol oxidase subunit 1	-1,08	-1,42	5,97
SL0437	<i>cyoA</i>	Ubiquinol oxidase subunit 2	-1,09	-1,17	6,05
SL0487	<i>ushA</i>	Protein ushA	-1,05	-1,36	4,38
SL0507	<i>allS</i>	lysR family transcriptional regulator	1,23	1,15	7,16
SL0508	<i>allA</i>	Ureidoglycolate hydrolase	-1,06	-1,21	2,65
SL0516	<i>allB</i>	Allantoinase	1,05	1,11	2,94
SL0518	<i>glxK</i>	Glycerate kinase 1	1,20	1,10	2,36
SL0521	<i>allD</i>	Ureidoglycolate dehydrogenase	-1,04	-1,46	5,10
SL0566	<i>nfnB</i>	Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	1,01	-1,13	2,14
SL0610	<i>citE</i>	Citrate lyase subunit beta	1,06	1,12	-2,50
SL0611	<i>citD</i>	Citrate lyase acyl carrier protein 1	-1,06	1,09	-2,36
SL0612	<i>citC</i>	[Citrate [pro-3S]-lyase] ligase	-1,02	1,10	-2,47
SL0673	<i>ifcA</i>	Fumarate reductase flavoprotein subunit	-1,01	-1,07	2,24
SL0676	<i>fldA</i>	Flavodoxin-1	-1,03	1,01	-1,98
SL0712	<i>gltA</i>	Citrate synthase	1,06	-1,00	2,70
SL0714	<i>sdhC</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit	-1,15	-1,23	8,34
SL0715	<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor subunit	-1,10	-1,29	6,00
SL0716	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1,00	-1,20	8,19
SL0717	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-1,01	-1,14	8,63
SL0718	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1,01	-1,26	2,25
SL0719	<i>sucB</i>	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	1,09	-1,10	2,41
SL0720	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	1,14	-1,24	3,54
SL0721	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	1,10	-1,07	2,39
SL0753	<i>galE</i>	UDP-glucose 4-epimerase	1,12	1,17	2,06
SL0764	<i>hutI</i>	Imidazolonepropionase	1,16	1,05	3,21
SL0765	<i>hutG</i>	Formimidoylglutamase	1,08	-1,06	4,38
SL0768	<i>hutH</i>	Histidine ammonia-lyase	-1,22	-1,51	18,07
SL0840	<i>deoR</i>	Deoxyribose operon repressor	1,00	1,10	-2,08
SL0848	<i>grxA</i>	Glutaredoxin-1	-1,19	-1,03	-1,99
SL0879	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,58	1,10	-5,97
SL0939	<i>dpaL</i>	Diaminopropionate ammonia-lyase	1,26	-1,27	3,64



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL1000	<i>ycbX</i>	Putative iron-sulfur protein	-1,07	-1,09	-2,33
SL1016	<i>mgsA</i>	Methylglyoxal synthase	1,08	1,22	2,85
SL1040	<i>hpaG</i>	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	-1,05	-1,11	7,56
SL1042	<i>hpcB</i>	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	-1,01	-1,16	6,00
SL1043	<i>hpcD</i>	5-carboxymethyl-2-hydroxyruconate Delta-isomerase	-1,06	-1,20	5,31
SL1044	<i>hpcG</i>	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase	-1,17	-1,78	3,18
SL1045	<i>hpcH</i>	4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase	-1,41	-2,00	3,02
SL1062	<i>putA</i>	Bifunctional protein putA	1,76	1,51	77,71
SL1067	<i>nanE1</i>	Putative N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase 1	1,14	1,00	4,53
SL1176	<i>icdA</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	-1,06	-1,25	3,29
SL1189	<i>yodB</i>	Cytochrome b561 homolog 1	-1,39	-1,02	-2,27
SL1220	<i>yeaG</i>	Uncharacterized protein yeaG	1,08	1,16	2,00
SL1239	<i>astA</i>	Arginine N-succinyltransferase	-1,37	-2,03	26,67
SL1240	<i>astD</i>	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	-1,43	-1,74	23,23
SL1261	<i>pfkB</i>	6-phosphofructokinase isozyme 2	1,16	1,13	2,15
SL1283	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthase	1,03	-1,18	4,30
SL1287	<i>ydiR</i>	Putative electron transfer flavoprotein subunit ydiR	-1,32	1,23	-2,22
SL1316	<i>rbsK</i>	Ribokinase	-1,13	-1,17	8,68
SL1317	<i>ttrA</i>	tetrathionate reductase subunit A	1,20	1,42	-2,14
SL1319	<i>ttrB</i>	Tetrathionate Reductase Subunit B	1,01	1,19	-2,70
SL1398	<i>fumA</i>	Fumarate hydratase class I, aerobic	1,13	-1,26	5,66
SL1400	<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II	1,16	1,05	4,75
SL1435	<i>rspA</i>	Starvation-sensing protein rspA	-1,55	-1,73	7,90
SL1436	<i>rspB</i>	Starvation-sensing protein rspB	-1,23	-1,45	8,06
SL1454	<i>ynel</i>	Aldehyde dehydrogenase-like protein ynel	-1,03	1,04	-2,65
SL1455	<i>glsA2</i>	Glutaminase 2	1,01	-1,08	-2,29
SL1466	<i>hupZ</i>	Probable Ni/Fe-hydrogenase B-type cytochrome subunit	-1,22	-1,24	2,79
SL1468	<i>hoxK</i>	Uptake hydrogenase small subunit	-1,12	-1,13	2,86
SL1471	<i>rspB</i>	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein HI_0053	-1,46	-1,07	2,30
SL1496	<i>sfcA</i>	NAD-dependent malic enzyme	1,20	-1,33	2,28
SL1501	<i>fdnG</i>	Formate dehydrogenase, nitrate-inducible, major subunit	-1,29	-2,04	1,12
SL1508	<i>narZ</i>	Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	1,02	1,04	6,46
SL1509	<i>narY</i>	Respiratory nitrate reductase 2 beta chain	-1,04	1,09	5,04
SL1510	<i>narW</i>	Probable nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarW	1,11	1,04	4,15
SL1511	<i>narV</i>	Respiratory nitrate reductase 2 gamma chain	1,08	1,07	4,38
SL1640	<i>yciM</i>	Uncharacterized protein yciM	-1,08	1,06	-2,25
SL1644	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase 1	1,18	1,02	3,38
SL1689	<i>narI</i>	Respiratory nitrate reductase 1 gamma chain	1,04	1,24	2,45
SL1690	<i>narJ</i>	Nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarJ	1,11	1,01	2,43
SL1691	<i>narH</i>	Respiratory nitrate reductase 1 beta chain	1,08	1,23	2,12
SL1692	<i>narG</i>	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	1,06	1,07	2,24
SL1714	<i>hyaA</i>	Hydrogenase-1 small chain	-1,30	-2,04	-2,23

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL1724	<i>treA</i>	Periplasmic trehalase	1,22	1,12	2,95
SL1731	<i>dadA</i>	D-amino acid dehydrogenase small subunit	-1,36	-1,36	9,25
SL1819	<i>edd</i>	Phosphogluconate dehydratase	-1,05	-1,08	-5,50
SL1872	-	Hypothetical	-1,40	1,13	-4,52
SL2051	<i>hisB</i>	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB	1,25	-1,13	2,86
SL2078	<i>wcaK</i>	Colanic acid biosynthesis protein wcaK	1,32	1,01	2,81
SL2081	<i>cpsG</i>	phosphomannomutase	1,91	1,15	2,85
SL2121	<i>yegV</i>	Uncharacterized sugar kinase yegV	-1,04	1,05	2,37
SL2145	<i>dld</i>	D-lactate dehydrogenase	1,09	-1,07	2,01
SL2152	<i>mhbM</i>	3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase	1,16	1,06	2,31
SL2153	<i>maiA</i>	Probable maleylacetoacetate isomerase	1,22	1,04	3,04
SL2154	<i>ycgM</i>	Uncharacterized protein PYRAB13970	-1,01	-1,03	3,97
SL2155	<i>gtdA</i>	Gentisate 1 2-Dioxygenase	1,03	1,05	5,13
SL2156	<i>pcaK</i>	4-hydroxybenzoate transporter	-1,10	-1,02	2,29
SL2157	<i>gbpR</i>	HTH-type transcriptional regulator gbpR	-1,37	-1,28	2,35
SL2181	<i>fruA</i>	PTS system fructose-specific EIIBC component	1,17	1,23	-10,61
SL2182	<i>fruK</i>	1-phosphofructokinase	1,06	1,18	-8,46
SL2205	<i>yejM</i>	Inner membrane protein yejM	1,01	-1,05	-2,01
SL2225	<i>napC</i>	Cytochrome c-type protein napC	1,06	-1,02	2,49
SL2227	<i>napH</i>	Ferredoxin-type protein napH	1,02	-1,02	2,21
SL2228	<i>napG</i>	Ferredoxin-type protein napG	1,15	-1,12	2,65
SL2229	<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase	1,17	-1,04	3,48
SL2265	<i>ais</i>	Lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase	-1,34	1,08	-4,74
SL2269	<i>arnD</i>	Probable 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose-phosphoundecaprenol deformylase ArnD	-1,35	-1,10	-2,06
SL2270	<i>arnT</i>	Undecaprenyl phosphate-alpha-4-amino-4-deoxy-L-arabinose arabinosyl transferase	-1,32	-1,01	-2,12
SL2277	<i>menH</i>	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase	1,44	1,02	-2,59
SL2287	<i>nuoL</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	1,04	-1,10	1,99
SL2288	<i>nuoK</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	1,03	-1,13	2,30
SL2290	<i>nuoI</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	1,02	-1,10	1,99
SL2299	<i>lrhA</i>	Probable HTH-type transcriptional regulator lrhA	-1,35	1,08	-2,65
SL2306	<i>ackA</i>	Acetate kinase	-1,09	-1,09	-3,07
SL2435	<i>maeB</i>	NADP-dependent malic enzyme	1,15	-1,08	5,97
SL2437	<i>tktB</i>	Transketolase 2	1,18	1,11	2,01
SL2510	<i>asrA</i>	Anaerobic sulfite reductase subunit A	1,36	1,67	-3,47
SL2511	<i>asrB</i>	Anaerobic sulfite reductase subunit B	1,26	1,34	-3,42
SL2512	<i>asrC</i>	Anaerobic sulfite reductase subunit C	1,33	1,46	-2,90
SL2518	<i>hmpA</i>	Flavoheмоprotein	-1,07	1,11	5,21
SL2519	<i>cadC</i>	Transcriptional activator cadC	1,07	-1,02	-2,31
SL2521	<i>cadA</i>	Lysine decarboxylase, inducible	1,46	-1,13	-4,98
SL2610	<i>grcA</i>	Autonomous glycyl radical cofactor	1,06	1,11	-2,16
SL2613	<i>trxC</i>	Thioredoxin-2	-1,10	1,03	-2,37
SL2764	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,45	1,10	-4,33

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL2815	<i>srlD</i>	Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase	1,14	-1,24	-2,47
SL2816	<i>gutM</i>	Glucitol operon activator protein	-1,01	-1,27	-2,46
SL2823	<i>hydN</i>	Electron transport protein hydN	1,30	1,10	-7,66
SL2826	<i>hycH</i>	Formate hydrogenlyase maturation protein hycH	1,04	1,06	2,01
SL2831	<i>hycC</i>	Formate hydrogenlyase subunit 3	1,05	-1,28	-3,72
SL2838	<i>hypE</i>	Hydrogenase isoenzymes formation protein hypE	1,17	-1,26	-2,56
SL2839	<i>fhIA</i>	Formate hydrogenlyase transcriptional activator	1,22	-1,02	-2,24
SL2895	<i>ygbL</i>	Putative aldolase class 2 protein ygbL	1,05	1,07	5,99
SL2897	<i>ygbJ</i>	Uncharacterized oxidoreductase ygbJ	-1,09	1,34	6,18
SL2927	<i>cysJ</i>	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	-1,07	-1,06	4,34
SL2951	<i>sdaB</i>	L-serine dehydratase 2	1,12	-1,07	3,60
SL2953	<i>fucO</i>	Lactaldehyde reductase	1,09	-1,04	3,10
SL2954	<i>fucA</i>	L-fuculose phosphate aldolase	-1,08	1,00	2,94
SL2959	<i>fucR</i>	L-fucose operon activator	-1,02	1,03	2,02
SL2977	<i>ppdB</i>	Prepilin peptidase-dependent protein B	-1,28	-1,11	2,36
SL3051	<i>cbiO</i>	Cobalt import ATP-binding protein CbiO	1,32	-1,15	2,12
SL3057	<i>yjmC</i>	Uncharacterized oxidoreductase yjmC	1,12	-1,35	2,33
SL3058	<i>yjjN</i>	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein yjjN	-1,14	-1,30	2,01
SL3059	<i>uxuB</i>	D-mannonate oxidoreductase	-1,09	-1,19	3,52
SL3081	<i>ansB</i>	L-asparaginase 2	1,62	1,25	4,33
SL3109	<i>uxuA</i>	Mannonate dehydratase	1,21	-1,08	3,06
SL3110	<i>uxuB</i>	D-mannonate oxidoreductase	1,20	-1,03	2,95
SL3111	<i>uxaC</i>	Uronate isomerase	1,15	1,04	2,61
SL3138	<i>yqhD</i>	Alcohol dehydrogenase yqhD	1,07	1,14	2,16
SL3170	<i>glgS</i>	Glycogen synthesis protein glgS	1,26	1,60	2,05
SL3214	<i>tdcD</i>	Propionate kinase	1,02	1,22	-2,52
SL3216	<i>tdcB</i>	Threonine dehydratase catabolic	-1,26	1,33	-2,06
SL3223	<i>garD</i>	D-galactarate dehydratase	1,28	1,27	2,13
SL3227	<i>fruK</i>	1-phosphofructokinase	-1,26	-1,39	-2,73
SL3228	<i>fruA</i>	PTS system fructose-specific EIIABC component	-1,11	-1,19	-2,11
SL3235	<i>gatR</i>	Galactitol utilization operon repressor	1,07	-1,04	4,26
SL3318	<i>yhcM</i>	Uncharacterized protein yhcM	-1,05	-1,10	-2,14
SL3324	<i>oadA</i>	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	1,21	-1,05	2,42
SL3326	<i>ttdB</i>	L(+)-tartrate dehydratase subunit beta	1,24	-1,32	3,29
SL3327	<i>ttdA</i>	L(+)-tartrate dehydratase subunit alpha	1,12	-1,23	4,25
SL3331	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	1,18	-1,00	4,77
SL3350	<i>yedY</i>	Sulfoxide reductase catalytic subunit yedY	1,06	-1,03	2,85
SL3357	<i>dusB</i>	tRNA-dihydrouridine synthase B	-1,42	-1,03	-3,85
SL3441	<i>nirB</i>	Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit	-1,07	1,83	-3,09
SL3442	<i>nirD</i>	Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit	1,11	1,18	-6,95
SL3482	<i>malT</i>	HTH-type transcriptional regulator malT	1,22	1,26	5,14
SL3491	<i>glpG</i>	Rhomboid protease glpG	-1,03	-1,07	-2,04
SL3503	<i>glgC</i>	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	1,25	1,15	2,20

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL3504	<i>glgX</i>	Glycogen debranching enzyme	1,17	-1,13	2,04
SL3505	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	1,20	-1,03	2,35
SL3513	<i>rbsK</i>	Ribokinase	-1,18	1,03	-2,44
SL3543	<i>tusA</i>	Sulfurtransferase tusA	-1,02	-1,15	-11,47
SL3563	<i>ansB</i>	L-asparaginase	1,21	-1,48	32,54
SL3565	<i>frlD</i>	Fructosamine kinase frlD	-1,09	-1,71	33,42
SL3577	<i>kdgK</i>	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	1,12	-1,08	4,32
SL3598	-	Hypothetical	-1,38	-1,04	-2,34
SL3612	<i>ghrB</i>	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	1,26	1,11	2,04
SL3625	<i>xylB</i>	Xylulose kinase	1,11	1,10	2,26
SL3626	<i>xylA</i>	Xylose isomerase	-1,06	-1,04	2,26
SL3633	<i>dlgD</i>	2,3-diketo-L-gulonate reductase	1,01	-1,07	4,51
SL3639	<i>lyxK</i>	L-xylulose/3-keto-L-gulonate kinase	1,14	1,11	2,70
SL3641	<i>sgbU</i>	Putative L-ribulose-5-phosphate 3-epimerase sgbU	1,45	1,69	3,77
SL3645	<i>aldB</i>	Aldehyde dehydrogenase B	1,01	1,23	2,38
SL3659	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase [cytochrome]	-1,46	-1,28	3,49
SL3670	<i>gpml</i>	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	-1,03	1,15	-3,23
SL3674	<i>tdh</i>	L-threonine 3-dehydrogenase	1,25	-1,10	3,79
SL3675	<i>kbl</i>	Putative 8-amino-7-oxononanoate synthase/2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	1,06	-1,25	2,94
SL3740	<i>gmuD</i>	6-phospho-beta-glucosidase gmuD	1,31	1,12	2,95
SL3759	<i>rbsK</i>	Ribokinase	1,14	1,11	3,60
SL3760	<i>deoR</i>	Deoxyribose operon repressor	1,28	-1,00	2,51
SL3789	<i>torC</i>	Cytochrome c-type protein torC	1,30	-1,04	-3,23
SL3794	<i>dgoD1</i>	D-galactonate dehydratase 1	1,47	1,07	3,20
SL3795	<i>dgoA</i>	2-dehydro-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase	1,43	1,31	2,97
SL3800	<i>dgoD</i>	D-galactonate dehydratase	-1,02	1,03	3,13
SL3831	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	1,19	1,07	3,56
SL3833	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	1,01	-1,31	2,51
SL3834	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	1,08	-1,18	2,05
SL3835	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit delta	-1,05	-1,17	2,01
SL3842	<i>mioC</i>	Protein mioC	1,08	1,05	-2,43
SL3965	<i>yihQ</i>	Alpha-glucosidase yihQ	1,27	-1,07	2,10
SL3968	<i>yihT</i>	Uncharacterized aldolase yihT	-1,06	-1,69	4,63
SL3970	<i>yihV</i>	Uncharacterized sugar kinase yihV	1,18	1,10	3,37
SL3986	<i>fdhD</i>	Protein fdhD	-1,04	1,08	-2,32
SL3993	<i>yiaY</i>	Probable alcohol dehydrogenase	1,63	1,51	1,98
SL3995	<i>rhaA</i>	L-rhamnose isomerase	1,07	-1,37	1,98
SL4015	<i>scrK</i>	Fructokinase	1,32	1,14	7,32
SL4021	<i>IsrK</i>	Autoinducer 2 kinase IsrK	1,15	-1,14	5,12
SL4118	<i>aceB</i>	Malate synthase A	-1,09	-1,09	7,52
SL4119	<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	-1,27	-1,09	4,68
SL4122	<i>iclR</i>	Acetate operon repressor	-1,08	-1,37	2,81
SL4185	<i>aphA</i>	Class B acid phosphatase	-1,19	-1,10	2,41
SL4213	<i>nrfA</i>	Cytochrome c-552	1,17	1,40	2,13

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Energy metabolism</b>					
SL4221	<i>fdhF</i>	Formate dehydrogenase H	1,16	1,06	-2,29
SL4234	<i>melR</i>	Melibiose operon regulatory protein	1,19	1,12	6,19
SL4316	<i>ulaA</i>	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	1,34	1,14	9,06
SL4320	<i>ulaE</i>	L-ribulose-5-phosphate 3-epimerase ulaE	1,06	-1,20	2,25
SL4334	<i>qorB</i>	Quinone oxidoreductase 2	1,06	1,26	2,70
SL4350	<i>hexR</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator HI_0143	-1,08	1,02	-2,14
SL4354	<i>iolA1</i>	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase [acylating] 1	1,29	1,10	3,93
SL4362	<i>iolD1</i>	3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase 1	1,04	-1,38	5,81
SL4366	<i>iolH</i>	Protein iolH	1,00	-1,15	2,02
SL4369	<i>cybC</i>	Soluble cytochrome b562	1,05	1,04	2,03
SL4384	<i>treC</i>	Trehalose-6-phosphate hydrolase	-1,16	1,06	2,06
SL4396	<i>arcC</i>	Carbamate kinase	2,65	1,92	-1,01
SL4414	<i>idnD</i>	L-idonate 5-dehydrogenase	1,71	-1,04	4,59
SL4415	<i>idnK</i>	Thermosensitive gluconokinase	1,14	1,03	2,28
SL4450	<i>ssdA</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	1,49	1,45	2,77
<b>Fatty acid and phospholipid metabolism</b>					
SL0871	<i>ybjS</i>	putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	-1,14	1,03	-2,45
SL1129	<i>plsX</i>	Phosphate acyltransferase	-1,11	-1,30	-4,72
SL1130	<i>fabH</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	1,17	-1,08	-2,12
SL2357	<i>fadJ</i>	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	-1,03	1,15	4,65
SL2408	<i>ucpA</i>	Oxidoreductase ucpA	1,35	1,16	3,08
SL2997	<i>yqeF</i>	Probable acetyl-CoA acetyltransferase	-1,08	-1,04	4,20
SL3192	<i>fadH</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH]	-1,06	1,12	6,90
SL3935	<i>fadA</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase	-1,12	-1,11	23,14
SL3936	<i>fadB</i>	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	-1,07	1,23	22,96
SL3978	<i>est</i>	Esterase	1,17	-1,01	3,87
SL4211	<i>acs</i>	Acetyl-coenzyme A synthetase	-1,26	-1,40	21,68
SL4310	<i>aidB</i>	Protein AidB	1,35	1,22	9,60
SL4353	<i>iolB</i>	5-deoxy-glucuronate isomerase	1,33	1,06	3,00
<b>Hypothetical proteins</b>					
SL0034	<i>yhcR</i>	Endonuclease yhcR	1,37	1,25	2,40
SL0692	<i>ybgI</i>	UPF0135 protein ybgI	1,14	1,06	2,27
SL0693	<i>ybgJ</i>	Uncharacterized protein ybgJ	1,17	1,00	2,74
SL0726	<i>ybgC</i>	Acyl-CoA thioester hydrolase ybgC	-1,13	1,13	-2,47
SL0828	<i>yliG</i>	putative Fe-S oxidoreductases family 1	-1,00	1,12	-2,33
SL0883	<i>clpS</i>	ATP-dependent Clp protease adapter protein clpS	-1,14	-1,01	-3,50
SL0999	<i>ycbW</i>	Uncharacterized protein ycbW	-1,29	-1,11	-3,12
SL1217	<i>yeaK</i>	Uncharacterized protein yeaK	-1,21	-1,22	-2,37
SL1227	<i>yeaC</i>	Uncharacterized protein yeaC	1,32	1,05	3,00
SL1602	-	Hypothetical	-1,76	1,08	-4,92

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Hypothetical proteins</b>					
SL1679	<i>ychE</i>	UPF0056 membrane protein yhcE	-1,34	1,25	-3,72
SL2159	<i>yohK</i>	Inner membrane protein yohK	1,04	-1,03	-12,19
SL3150	<i>ygiW</i>	Protein ygiW	1,35	1,23	1,98
SL3270	<i>yhbY</i>	RNA-binding protein yhbY	2,18	1,01	1,19
SL3301	<i>yhcC</i>	Uncharacterized protein yhcC	1,03	1,15	-3,69
SL3419	<i>yheO</i>	Uncharacterized protein yheO	-1,04	1,03	-3,74
SL4180	<i>pspG</i>	Phage shock protein G	-1,04	1,32	-2,02
SL4270	<i>yjeK</i>	Uncharacterized KamA family protein YjeK	1,08	1,01	-2,15
SL4377	-	Hypothetical	1,23	-1,01	2,59
SL4429	<i>yeeN</i>	UPF0082 protein LACR_0237	1,08	-1,07	-2,10
<b>Prophages and transposons</b>					
SL0808	<i>ompX</i>	Outer membrane protein X	-1,01	1,19	-2,41
SL0885	<i>tnpA1</i>	Transposase for insertion sequence element IS1541	1,26	-1,00	-2,87
SL1181	<i>envE</i>	Probable lipoprotein envE	-1,28	1,13	-3,82
SL1443	<i>ymdF</i>	Uncharacterized protein ymdF	-1,27	1,29	-2,06
SL1560	<i>tfpB</i>	Protein tfpB	-1,29	1,88	-2,37
SL1617	<i>pspD</i>	Phage shock protein D	-1,19	1,34	-2,02
SL1660	<i>yciF</i>	Protein yciF	-1,73	1,18	-3,65
SL1662	<i>katN</i>	Probable manganese catalase	-1,31	1,20	-2,83
SL1782	<i>pphA</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 1	-1,24	1,06	-4,92
SL1800	<i>ycdD</i>	Tail fiber assembly protein homolog from lambdoid prophage Fels-1	-1,84	-1,23	-2,96
SL1804	-	Hypothetical	-1,63	-1,36	-3,58
SL1806	<i>intE</i>	Prophage lambda integrase	1,05	1,01	2,88
SL2043	<i>sopA</i>	E3 ubiquitin-protein ligase SopA	-1,29	-1,17	-11,05
SL2212	-	Prohead Protease	1,04	1,13	-2,07
SL2214	<i>pifA</i>	KAP P-Loop Domain-Containing Protein	-1,29	-1,52	2,07
SL2640	-	Hypothetical Protein SL2640	1,13	1,04	2,32
SL2747	<i>intA</i>	Prophage CP4-57 integrase	-1,07	1,00	2,76
SL2756	<i>fljB</i>	Phase 2 flagellin	-2,40	-1,63	-1,84
SL3010	-	Virulence membrane protein	-1,03	1,16	2,46
SL3524	<i>kil</i>	Death On Curing Protein	1,38	1,12	4,53
SL3811	<i>intA</i>	Prophage CP4-57 integrase	-1,46	-1,21	-1,99
SL4248	-	Hypothetical	-2,43	-1,91	-28,20
<b>Protein fate</b>					
SL0012	<i>dnaK</i>	Chaperone protein dnaK	1,05	1,13	2,97
SL0013	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein dnaJ	-1,06	-1,09	2,03
SL0144	<i>ppdD</i>	Prepilin peptidase-dependent protein D	-1,04	1,06	2,04
SL0266	<i>clpB</i>	Chaperone protein clpB	1,15	-1,36	3,43
SL0444	<i>lon</i>	Hypothetical Protein lon	1,07	1,06	2,44
SL0480	<i>htpG</i>	Chaperone protein htpG	1,08	-1,04	3,68
SL0520	<i>allC</i>	Allantoate amidohydrolase	-1,08	-1,17	3,13
SL0522	<i>fdrA</i>	Protein fdrA	1,14	1,12	3,41
SL0538	<i>fimC</i>	Chaperone protein fimC	-2,52	-1,37	-22,44
SL0612	<i>citC</i>	[Citrate [pro-3S]-lyase] ligase	-1,02	1,10	-2,47
SL0620	<i>tatE</i>	Sec-independent protein translocase protein tatE	-1,01	1,14	-2,04

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Protein fate</b>					
SL0655	<i>Int</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase	-1,21	-1,42	-2,17
SL0879	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,58	1,10	-5,97
SL1090	<i>msyB</i>	Acidic protein msyB	1,23	1,20	2,50
SL1314	<i>pip</i>	Proline iminopeptidase	-1,21	-1,35	4,08
SL1376	<i>slyA</i>	Transcriptional regulator slyA	-1,20	1,17	-2,26
SL1525	<i>srfB</i>	Virulence Protein SrfB	1,49	-1,02	4,34
SL1531	<i>ugtL</i>	D-Alanyl-D-Alanine Dipeptidase	-2,42	1,47	-4,95
SL1542	<i>sgcX</i>	Putative aminopeptidase sgcX	1,37	1,22	2,48
SL1551	<i>yceI</i>	UPF0312 protein VPA0850	1,36	1,06	2,34
SL1706	<i>lolB</i>	Outer-membrane lipoprotein lolB	-1,13	-1,15	-2,18
SL1824	<i>yebA</i>	Uncharacterized metalloprotease yebA	-1,16	-1,12	-2,29
SL2051	<i>hisB</i>	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB	1,25	-1,13	2,86
SL2205	<i>yejM</i>	Inner membrane protein yejM	1,01	-1,05	-2,01
SL2212	-	Prohead Protease	1,04	1,13	-2,07
SL2363	<i>pgtE</i>	Outer membrane protease E	-2,81	1,47	-2,42
SL2495	<i>sseA</i>	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	1,08	1,25	2,90
SL2502	<i>hscB</i>	Co-chaperone protein hscB	1,01	1,05	-2,38
SL2620	<i>clpB</i>	Chaperone protein clpB	1,03	1,15	2,60
SL2764	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,45	1,10	-4,33
SL2825	<i>hycl</i>	Hydrogenase 3 maturation protease	1,09	1,09	2,56
SL2899	<i>slyA</i>	Transcriptional regulator	-1,10	1,09	2,00
SL3166	<i>dsbA</i>	Thiol:disulfide interchange protein dsbA	-1,19	-1,13	3,06
SL3264	<i>secG</i>	Protein-export membrane protein secG	-1,16	1,05	-2,46
SL3373	<i>def</i>	Peptide deformylase	1,02	1,07	-2,19
SL3543	<i>tusA</i>	Sulfurtransferase tusA	-1,02	-1,15	-11,47
SL3559	<i>prlC</i>	Oligopeptidase A	1,01	-1,10	-2,03
SL3596	<i>dppA</i>	Periplasmic dipeptide transport protein	1,12	1,02	3,36
SL3598	-	Hypothetical	-1,38	-1,04	-2,34
SL3671	<i>yibP</i>	Uncharacterized protein yibP	-1,07	-1,17	-2,15
SL3776	<i>ibpA</i>	Small heat shock protein ibpA	1,29	1,47	3,13
SL4185	<i>aphA</i>	Class B acid phosphatase	-1,19	-1,10	2,41
SL4266	<i>groS</i>	10 kDa chaperonin	1,19	1,04	3,79
SL4267	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	1,17	-1,02	2,58
SL4316	<i>ulaA</i>	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	1,34	1,14	9,06
SL4407	<i>pepA</i>	Probable cytosol aminopeptidase	1,17	-1,08	2,78
<b>Protein synthesis</b>					
SL0044	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-1,21	1,09	-3,04
SL0096	<i>rluA</i>	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase A	2,03	1,02	2,39
SL0186	<i>yadB</i>	glutamyl-tRNA synthetase	-1,27	-1,04	-3,74
SL0212	<i>yaeH</i>	UPF0325 protein ESA_03178	-1,12	-1,14	3,29
SL0265	<i>sciF</i>	Cytoplasmic Protein	1,19	1,05	2,97
SL0268	<i>scil</i>	Hypothetical	1,09	-1,15	2,77
SL0399	<i>queA</i>	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	-1,10	1,07	-2,69
SL0641	<i>ybeL</i>	Uncharacterized protein ybeL	1,43	1,38	4,14

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Protein synthesis</b>					
SL0649	-	Hypothetical	-1,06	1,02	2,03
SL0681	-	5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance Protein	1,06	1,14	-5,70
SL0829	<i>bssR</i>	Biofilm regulator BssR	1,61	2,18	2,38
SL0889	<i>yhhW</i>	Pirin-like protein PA2418	1,22	1,23	2,37
SL1104	<i>rimJ</i>	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	1,23	1,04	2,57
SL1172	<i>trmU</i>	tRNA-specific 2-thiouridylase mnmA	1,06	1,12	-2,25
SL1177	-	Bacteriophage Protein	-2,96	1,17	-25,20
SL1186	-	Hypothetical	-1,47	1,10	-4,22
SL1315	-	Hypothetical	-1,21	-1,22	3,97
SL1393	<i>cnu</i>	OriC-binding nucleoid-associated protein	-1,19	1,07	-2,33
SL1477	<i>queA</i>	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	-1,49	1,25	-1,99
SL1541	<i>rimL</i>	Ribosomal-protein-serine acetyltransferase	1,16	1,11	2,07
SL1704	<i>prfA</i>	Peptide chain release factor 1	1,21	1,09	-2,31
SL1727	<i>emtA</i>	Endo-type membrane-bound lytic murein transglycosylase A	1,00	1,06	-2,10
SL1732	<i>ycgB</i>	Uncharacterized protein ycgB	-1,06	1,21	2,94
SL1779	<i>yebU</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	1,12	1,03	-2,70
SL1840	<i>cmoA</i>	tRNA (cmo5U34)-methyltransferase	-1,01	-1,08	-2,10
SL1844	<i>argS</i>	Arginyl-tRNA synthetase	-1,23	1,04	-3,31
SL1896	-	putative 50S ribosomal protein	-1,92	-1,34	-3,36
SL2052	<i>hisH</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	1,21	-1,23	2,78
SL2114	<i>cesT</i>	Tir chaperone	-3,66	1,12	-1,47
SL2204	<i>yejL</i>	UPF0352 protein yejL	-1,17	-1,16	-2,47
SL2256	<i>sseL</i>	Deubiquitinase sseL	-7,62	1,57	-9,57
SL2327	-	Amino Acid Racemase	1,18	1,13	2,86
SL2438	-	Hypothetical	-1,08	-1,04	-2,50
SL2469	-	Hypothetical	1,52	1,35	-2,17
SL2484	<i>hisS</i>	Histidyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,10	-2,15
SL2507	<i>trmJ</i>	tRNA (cytidine/uridine-2'-O-)-methyltransferase trmJ	1,39	1,02	-2,12
SL2622	<i>rluD</i>	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	-1,02	-1,09	-2,26
SL2726	-	Hypothetical	-1,35	-1,30	-2,11
SL2785	<i>ygaC</i>	Uncharacterized protein ygaC	-1,02	1,22	-2,25
SL2881	-	Hypothetical	-1,52	-1,00	-3,47
SL2915	<i>iap</i>	Alkaline phosphatase isozyme conversion protein	-1,08	-1,03	-3,91
SL3017	<i>prfB</i>	Peptide chain release factor 2	-1,09	-1,04	-2,12
SL3125	<i>yghW</i>	Uncharacterized protein yghW	-1,36	1,16	-6,35
SL3129	-	Hypothetical	-1,27	1,09	-5,12
SL3130	-	Hypothetical	-1,43	-1,26	-7,27
SL3183	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	-1,10	1,23	-3,63
SL3261	<i>rimP</i>	Ribosome maturation factor rimP	-1,28	-1,08	-2,79
SL3263	-	Hypothetical	-1,04	1,35	-2,48
SL3275	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	-1,33	-1,01	-3,03
SL3276	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	-1,20	1,03	-2,51
SL3293	<i>yhbH</i>	Probable sigma(54) modulation protein	1,24	1,43	2,78



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Protein synthesis</b>					
SL3335	<i>yhcO</i>	Uncharacterized protein yhcO	1,30	1,51	5,06
SL3374	<i>fmt</i>	Methionyl-tRNA formyltransferase	-1,06	-1,16	-3,52
SL3375	<i>rsmB</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B	-1,04	-1,17	-4,60
SL3420	<i>fkpA</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpA	-1,28	-1,11	-2,76
SL3428	<i>ydhR</i>	Putative monooxygenase ydhR	1,17	1,08	2,59
SL3474	<i>feoC</i>	Ferrous iron transport protein C	-1,20	1,24	-2,73
SL3514	-	Hypothetical	-1,08	1,27	-3,60
SL3525	<i>yhhV</i>	Uncharacterized protein yhhV	1,35	1,25	4,30
SL3653	<i>yibT</i>	Uncharacterized protein yibT	1,13	1,35	5,71
SL3757	-	Hypothetical	1,24	1,05	3,49
SL3806	<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34	-1,09	1,07	-2,20
SL3961	-	Hypothetical	-1,19	-1,13	2,67
SL3977	<i>ygiN</i>	Uncharacterized protein ygiN	1,03	-1,00	2,34
SL4019	<i>cdh</i>	CDP-diacylglycerol pyrophosphatase	1,01	1,06	2,10
SL4078	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	1,06	1,07	-1,99
SL4121	-	Hypothetical	-1,13	-1,65	2,21
SL4239	-	Hypothetical	-1,18	1,39	-24,27
SL4252	-	Hypothetical	-1,52	1,12	-5,47
SL4260	<i>dsbD</i>	Thiol:disulfide interchange protein dsbD	-1,04	-1,45	-2,77
SL4327	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	-1,15	1,10	-2,28
SL4341	<i>msrA</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase msrA	-1,09	1,23	2,87
SL4361	<i>ioIC</i>	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	1,02	-1,26	5,41
SL4365	-	Xylose Isomerase Domain-Containing Protein	1,03	-1,04	2,81
SL4371	-	Hypothetical	1,37	1,18	2,22
SL4372	-	Hypothetical	1,39	1,09	2,71
SL4376	<i>selA</i>	Uncharacterized protein mlr3804	1,21	1,00	2,54
SL4430	<i>yjhP</i>	Uncharacterized protein yjhP	1,27	1,18	2,26
SL4434	-	Hypothetical	-2,10	1,20	-4,98
SL4438	<i>trpS</i>	Tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,11	2,21
SL4460	-	Hypothetical	1,26	1,49	3,02
SL4484	<i>rsmC</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase C	1,03	-1,07	-2,63
<b>Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides</b>					
SL0052	<i>rihC</i>	Non-specific ribonucleoside hydrolase rihC	1,40	1,26	3,12
SL0068	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	1,02	1,13	2,03
SL0313	<i>gpt</i>	Xanthine phosphoribosyltransferase	1,09	1,06	-2,59
SL0484	<i>gsk</i>	Inosine-guanosine kinase	1,01	1,00	-2,02
SL0521	<i>allD</i>	Ureidoglycolate dehydrogenase	-1,04	-1,46	5,10
SL0552	<i>ykgC</i>	Probable pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase ykgC	1,12	1,11	2,34
SL0650	<i>rihA</i>	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase rihA	-1,07	-1,01	2,38
SL0917	<i>cmk</i>	Cytidylate kinase	-1,13	1,12	-2,16
SL1220	<i>yeaG</i>	Uncharacterized protein yeaG	1,08	1,16	2,00

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides</b>					
SL1278	<i>cdgR</i>	Cyclic di-GMP regulator <i>cdgR</i>	-1,08	1,07	-2,05
SL1395	<i>add</i>	Adenosine deaminase	-2,04	1,21	-2,80
SL1455	<i>glsA2</i>	Glutaminase 2	1,01	-1,08	-2,29
SL1639	<i>pyrF</i>	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-1,46	1,05	-2,53
SL2057	<i>udg</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	-1,82	1,07	-6,30
SL2099	<i>udk</i>	Uridine kinase	1,19	1,20	-2,45
SL2160	<i>cdd</i>	Cytidine deaminase	1,03	-1,06	-8,24
SL2462	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	-1,04	1,28	-2,28
SL2471	<i>guaA</i>	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	1,01	1,02	-2,32
SL2472	<i>guaB</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	-1,09	1,02	-3,20
SL2488	<i>ndk</i>	Nucleoside diphosphate kinase	1,18	1,01	6,14
SL2527	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	1,27	1,43	2,08
SL2949	<i>ygdH</i>	LOG family protein <i>ygdH</i>	1,08	-1,08	2,16
SL2979	<i>thyA</i>	Thymidylate synthase	1,04	-1,03	-2,07
SL4020	-	Conserved Hypothetical Protein	1,21	1,00	3,55
SL4336	<i>cpdB</i>	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase	1,31	1,04	4,00
SL4375	-	Dihydroorotase	1,22	-1,08	2,21
SL4381	<i>nrdG</i>	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase-activating protein	1,27	-1,20	-2,24
SL4382	<i>nrdD</i>	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	1,27	-1,05	-2,21
SL4496	<i>deoB</i>	Phosphopentomutase	-1,09	-1,00	-2,17
<b>Regulatory functions</b>					
SL0066	-	putative viral protein	1,03	-1,28	-4,48
SL0151	<i>pdhR</i>	Pyruvate dehydrogenase complex repressor	-1,06	-1,15	-2,74
SL0349	<i>hmrR</i>	HTH-type transcriptional regulator <i>hmrR</i>	1,16	1,30	2,01
SL0362	<i>prpR</i>	Propionate catabolism operon regulatory protein	1,09	-1,04	2,42
SL0363	<i>prpB</i>	Methylisocitrate lyase	1,04	1,27	2,74
SL0551	<i>ykgD</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator <i>ykgD</i>	1,16	1,20	3,20
SL0559	<i>levR</i>	Transcriptional regulatory protein <i>levR</i>	1,07	-1,01	2,64
SL0588	<i>cstA</i>	Carbon starvation protein A	-1,16	-1,23	9,48
SL0613	<i>dpiB</i>	Sensor histidine kinase <i>DpiB</i>	-1,09	1,19	-3,56
SL0614	<i>dpiA</i>	Transcriptional regulatory protein <i>DpiA</i>	1,03	1,04	-2,28
SL0672	<i>citB</i>	Citrate utilization protein B	1,06	-1,08	3,82
SL0675	<i>fur</i>	Ferric uptake regulation protein	1,00	1,07	-2,81
SL0740	<i>ywbl</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator <i>ywbl</i>	1,10	1,17	3,02
SL0766	<i>hutC</i>	Histidine utilization repressor	-1,14	-1,08	2,51
SL0824	<i>gsiA</i>	Glutathione import ATP-binding protein <i>gsiA</i>	1,11	-1,26	2,57
SL0835	<i>cysL</i>	HTH-type transcriptional regulator <i>cysL</i>	-1,55	1,10	-5,57
SL0879	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein <i>ybjX</i>	-1,58	1,10	-5,97

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Regulatory functions</b>					
SL0909	<i>sopD2</i>	Secreted effector protein sopD2	-8,04	1,35	-3,81
SL1065	<i>yfeT</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator HI_0143	-1,09	-1,13	-2,08
SL1168	<i>phoQ</i>	Virulence sensor histidine kinase phoQ	-1,28	-1,16	-2,17
SL1201	<i>ycgE</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator ycgE	-1,06	1,11	-2,37
SL1220	<i>yeaG</i>	Uncharacterized protein yeaG	1,08	1,16	2,00
SL1405	<i>rstA</i>	Transcriptional regulatory protein rstA	-1,14	1,08	-3,50
SL1422	<i>opuCB</i>	Glycine betaine/carnitine/choline transport system permease protein opuCB	1,01	-1,06	3,34
SL1476	-	MarR Family Transcriptional Regulator	-1,08	-1,08	2,15
SL1525	<i>srfB</i>	Virulence Protein SrfB	1,49	-1,02	4,34
SL1607	<i>yhjC</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yhjC	1,09	1,08	2,41
SL2055	<i>hisI</i>	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisIE	1,21	-1,08	2,06
SL2075	<i>galF</i>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1,03	1,11	-2,43
SL2261	<i>yfaX</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yfaX	1,42	1,43	2,53
SL2330	<i>rocR</i>	Arginine utilization regulatory protein rocR	1,21	1,43	1,99
SL2542	<i>era</i>	GTP-binding protein era homolog	-1,00	-1,09	-2,18
SL2602	<i>rseB</i>	Sigma-E factor regulatory protein rseB	-1,23	-1,41	-2,07
SL2743	<i>sgrR</i>	HTH-type transcriptional regulator sgrR	1,10	1,41	3,19
SL2764	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,45	1,10	-4,33
SL2765	<i>mig-14</i>	putative transcriptional regulator	-1,67	-1,35	-3,63
SL2787	<i>mocR</i>	Probable rhizopine catabolism regulatory protein mocR	1,16	1,01	2,22
SL2833	<i>hycA</i>	Formate hydrogenlyase regulatory protein hycA	1,02	-1,01	-7,96
SL2949	<i>ygdH</i>	LOG family protein ygdH	1,08	-1,08	2,16
SL2962	<i>gcvA</i>	Glycine cleavage system transcriptional activator	-1,22	1,12	-2,75
SL3095	<i>budR</i>	HTH-type transcriptional regulator BudR	1,05	-1,27	2,43
SL3217	<i>tdcA</i>	HTH-type transcriptional regulator tdcA	1,55	1,55	5,57
SL0104	<i>araC</i>	Arabinose operon regulatory protein	1,10	-1,07	10,58
SL3314	<i>sspA</i>	Stringent starvation protein A	-1,25	-1,02	-2,69
SL3328	<i>yfbS</i>	Uncharacterized transporter MJ0672	1,00	-1,49	3,26
SL3330	<i>pdhR</i>	GntR Family Transcriptional Regulator	-1,09	-1,03	-2,07
SL3571	<i>yhjB</i>	Putative HTH-type transcriptional regulator yhjB	-1,50	1,26	-3,03
SL3572	<i>yhjC</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yhjC	1,07	-1,06	2,24
SL3643	<i>yisR</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yisR	1,24	-1,19	4,41
SL3658	<i>lldR</i>	Putative L-lactate dehydrogenase operon regulatory protein	-1,51	-1,00	2,62
SL3738	<i>levR</i>	Transcriptional regulatory protein levR	1,15	1,07	2,12
SL3751	<i>mngR</i>	Mannosyl-D-glycerate transport/metabolism system repressor mngR	1,24	1,41	3,65
SL3768	<i>dsdC</i>	HTH-type transcriptional regulator dsdC	1,47	1,01	3,96
SL3790	<i>torR</i>	TorCAD operon transcriptional regulatory protein torR	1,28	-1,04	4,44
SL3797	<i>dgoR</i>	Galactonate operon transcriptional repressor	-1,02	-1,09	2,58

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Regulatory functions</b>					
SL3801	<i>ybhD</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator <i>ybhD</i>	1,43	1,16	4,56
SL3873	<i>gppA</i>	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase	-1,03	-1,19	-2,09
SL3894	<i>cyaA</i>	Adenylate cyclase	-1,09	1,05	-2,83
SL3980	-	Transcriptional Regulator XRE Family	1,06	-1,11	2,21
SL3997	<i>rhaS</i>	HTH-type transcriptional activator <i>rhaS</i>	1,24	1,44	7,48
SL3998	<i>rhaR</i>	HTH-type transcriptional activator <i>rhaR</i>	1,11	1,18	3,48
SL4104	<i>rsd</i>	Regulator of sigma D	-1,03	1,26	3,58
SL4112	<i>zraS</i>	Sensor protein <i>zraS</i>	1,18	-1,03	2,34
SL4174	<i>lexA</i>	LexA repressor	1,13	1,16	2,28
SL4201	<i>soxS</i>	Regulatory protein <i>soxS</i>	-1,57	-1,10	-3,63
SL4250	<i>rtsB</i>	GerE Family Regulatory Protein	-3,14	-2,47	-60,33
SL4251	<i>rtsA</i>	Transcriptional regulator <i>sirC</i>	-2,64	-1,89	-47,96
SL4355	<i>ydiP</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator <i>ydiP</i>	1,09	1,48	6,37
SL4393	<i>argR</i>	Arginine repressor	2,49	1,35	-1,35
SL4395	<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase, catabolic	2,46	1,57	-1,54
SL4397	<i>arcA</i>	Arginine deiminase	2,65	2,16	1,41
SL4463	<i>yjiY</i>	Inner membrane protein <i>yjiY</i>	1,11	1,19	-18,87
SL4465	<i>levR</i>	Transcriptional regulatory protein <i>levR</i>	1,19	1,17	1,99
SL4510	<i>trpR</i>	Trp operon repressor	1,10	-1,25	2,05
<b>Transcription</b>					
SL0185	<i>pcnB</i>	Poly(A) polymerase	-1,08	-1,04	-2,92
SL0300	<i>sinR</i>	Probable HTH-type transcriptional regulator <i>sinR</i>	-1,68	-1,43	-2,91
SL0605	<i>rna</i>	Ribonuclease I	-1,07	1,13	-2,35
SL0672	<i>citB</i>	Citrate utilization protein B	1,06	-1,08	3,82
SL0796	<i>rhIE</i>	ATP-dependent RNA helicase <i>rhIE</i>	-1,30	-1,24	-4,28
SL1366	<i>rnt</i>	Ribonuclease T	1,06	-1,20	-2,27
SL2107	<i>baeS</i>	Signal transduction histidine-protein kinase <i>BaeS</i>	-1,25	-1,02	-2,13
SL3271	<i>greA</i>	Transcription elongation factor <i>greA</i>	-97,36	1,03	0,00
SL2543	<i>rnc</i>	Ribonuclease 3	-1,05	1,00	-2,47
SL2604	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma-E factor	-1,10	-1,09	-2,10
SL2624	<i>raiA</i>	Ribosome-associated inhibitor A	1,15	1,42	2,90
SL2756	<i>fljB</i>	Phase 2 flagellin	-2,40	-1,63	-1,84
SL2768	<i>tctE</i>	Sensor protein <i>tctE</i>	-1,13	-1,40	7,27
SL2769	<i>tctD</i>	Transcriptional regulatory protein <i>tctD</i>	1,03	1,08	13,84
SL2903	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor <i>rpoS</i>	1,17	1,12	2,05
SL3253	<i>deaD</i>	Cold-shock DEAD box protein A	-1,04	-1,06	-8,59
SL3470	<i>greB</i>	Transcription elongation factor <i>greB</i>	1,06	-22,80	-59,94
SL3700	<i>rph</i>	Ribonuclease PH	1,16	1,06	-2,20
SL3738	<i>levR</i>	Transcriptional regulatory protein <i>levR</i>	1,15	1,07	2,12
SL3807	<i>rnpA</i>	Ribonuclease P protein component	-1,08	1,00	-2,10
SL3874	<i>rhIB</i>	ATP-dependent RNA helicase <i>rhIB</i>	-1,08	-1,34	-2,45
SL3876	<i>rho</i>	Transcription termination factor <i>rho</i>	-1,08	1,01	-3,61
SL4093	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1,17	1,01	2,04

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL0043	<i>xyIP</i>	putative sodium galactoside symporter	1,11	-1,37	7,93
SL0055	<i>oadB1</i>	Oxaloacetate decarboxylase beta chain 1	1,32	1,13	2,23
SL0056	<i>oadA</i>	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	1,21	-1,06	2,57
SL0057	<i>oadG1</i>	Probable oxaloacetate decarboxylase gamma chain 1	1,12	-1,07	4,14
SL0058	<i>citC</i>	Citrate-sodium symporter	-1,32	-1,22	3,02
SL0150	<i>aroP</i>	Aromatic amino acid transport protein AroP	1,04	-1,07	2,45
SL0162	<i>kdgT</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease 1	1,26	1,09	2,83
SL0213	<i>shiA</i>	Shikimate transporter	-1,19	1,05	-2,38
SL0337	-	Periplasmic Protein	-1,33	-1,26	-2,23
SL0348	<i>actP</i>	Copper-transporting P-type ATPase	1,08	-1,11	4,15
SL0350	-	putative copper chaperone	1,36	-1,02	2,36
SL0351	<i>yjhB</i>	Putative metabolite transport protein yjhB	-1,16	-1,13	2,18
SL0360	<i>yahN</i>	Uncharacterized membrane protein yahN	1,41	1,47	3,45
SL0371	<i>sbmA</i>	Protein sbmA	1,23	-1,04	-2,98
SL0395	<i>proY</i>	Proline-specific permease proY	1,33	1,01	-2,05
SL0415	<i>yajO</i>	Uncharacterized oxidoreductase yajO	1,20	1,41	2,32
SL0513	<i>yybO</i>	metabolite transport protein	1,43	1,14	4,88
SL0515	<i>ybbW</i>	Putative allantoin permease	1,66	1,02	3,89
SL0585	<i>entB</i>	Isochorismatase	1,10	1,23	2,00
SL0615	<i>dcuC</i>	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter dcuC	1,18	1,06	-2,87
SL0639	<i>kdgT2</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease 2	1,23	1,24	-2,50
SL0651	<i>gltL</i>	Glutamate/aspartate transport ATP-binding protein gltL	-1,77	-2,15	8,59
SL0652	<i>gltK</i>	Glutamate/aspartate transport system permease protein gltK	-1,72	-2,00	8,36
SL0653	<i>gltJ</i>	Glutamate/aspartate transport system permease protein gltJ	-1,52	-1,47	5,50
SL0654	<i>gltI</i>	Glutamate/aspartate periplasmic-binding protein	-1,40	-1,20	6,78
SL0671	<i>citA</i>	Citrate-proton symporter	-1,21	-1,15	2,57
SL0682	<i>potE</i>	Putrescine-ornithine antiporter	1,06	-1,20	-4,57
SL0691	<i>ntpD</i>	Dipeptide permease D	1,38	-1,01	-2,14
SL0727	<i>tolQ</i>	Protein tolQ	-1,29	-1,15	-2,54
SL0728	<i>tolR</i>	Protein tolR	-1,08	-1,01	-2,59
SL0745	<i>oadB2</i>	Oxaloacetate decarboxylase beta chain	1,38	1,16	2,25
SL0760	<i>modC</i>	Molybdenum import ATP-binding protein ModC	-1,14	-1,11	-2,39
SL0803	<i>glnQ</i>	Glutamine transport ATP-binding protein glnQ	-1,06	-1,33	2,29
SL0805	<i>glnH</i>	Glutamine-binding periplasmic protein	1,14	-1,22	3,68
SL0807	<i>ybiF</i>	Inner membrane transporter rhtA	1,01	-1,06	-2,23
SL0813	<i>ybiT</i>	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein ybiT	-1,23	1,08	-2,82
SL0825	<i>gsiB</i>	Glutathione-binding protein gsiB	1,21	1,04	3,72
SL0826	<i>gsiC</i>	Glutathione transport system permease protein gsiC	1,27	1,11	2,09
SL0836	<i>yxjC</i>	Uncharacterized transporter yxjC	-1,04	1,32	-2,37
SL0846	<i>ybjL</i>	Putative transport protein ybjL	-1,04	1,02	-2,78
SL0854	<i>potF</i>	Putrescine-binding periplasmic protein	1,10	1,26	3,91

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL0855	<i>potG</i>	Putrescine transport ATP-binding protein potG	1,38	1,04	2,73
SL0856	<i>potH</i>	Putrescine transport system permease protein potH	1,29	1,16	2,71
SL0880	<i>macA</i>	Macrolide-specific efflux protein macA	-1,09	1,04	-2,43
SL0895	<i>cydD</i>	ATP-binding/permease protein cydD	1,01	-1,03	-2,02
SL0911	<i>focA</i>	Probable formate transporter 1	-1,06	-1,08	-7,51
SL0921	<i>msbA</i>	Lipid A export ATP-binding/permease protein msbA	-1,08	-1,02	-2,20
SL0940	<i>yflA</i>	putative transcriptional regulator, Lrp family	1,28	1,08	3,99
SL1046	<i>hpaX</i>	putative 4-hydroxyphenylacetate permease	1,13	-1,13	3,69
SL1061	-	Uncharacterized protein R02472	1,20	1,19	9,50
SL1063	<i>putP</i>	Sodium/proline symporter	1,15	-1,25	12,16
SL1066	<i>sgIT</i>	Sodium/glucose cotransporter	1,15	-1,18	6,36
SL1070	<i>yjhB</i>	Putative metabolite transport protein yjhB	-1,31	-1,41	2,42
SL1154	<i>lolC</i>	Lipoprotein-releasing system transmembrane protein lolC	1,20	1,01	-2,02
SL1160	<i>potC</i>	Spermidine/putrescine transport system permease protein potC	-1,49	-1,06	-2,92
SL1191	<i>xp55</i>	Protein XP55	1,49	-1,02	3,96
SL1192	<i>dppB</i>	Putative peptide transport system permease protein BMEII0209	1,22	-1,42	2,88
SL1194	<i>nikD</i>	Nickel import ATP-binding protein NikD	1,11	-1,20	2,65
SL1198	<i>yodA</i>	Metal-binding protein yodA	1,34	1,13	2,48
SL1205	<i>leuE</i>	Leucine efflux protein	-1,32	-1,11	-2,13
SL1247	<i>celA</i>	N,N'-diacetylchitobiose-specific phosphotransferase enzyme IIB component	-1,10	-1,11	2,05
SL1248	<i>celB</i>	N,N'-diacetylchitobiose permease IIC component	1,03	-1,15	2,19
SL1255	<i>ydjN</i>	Uncharacterized symporter ydjN	-1,04	1,01	3,28
SL1294	<i>ydiN</i>	Inner membrane transport protein ydiN	1,50	1,58	-2,01
SL1302	<i>ydjN</i>	Uncharacterized symporter ydjN	1,07	-1,02	6,96
SL1313	<i>puuP</i>	Putrescine importer	-1,06	-1,08	4,25
SL1360	<i>ydhC</i>	Inner membrane transport protein ydhC	-1,19	-1,07	-24,59
SL1421	<i>opuBA</i>	Choline transport ATP-binding protein opuBA	1,03	1,04	2,73
SL1423	<i>opuCC</i>	Glycine betaine/carnitine/choline-binding protein	1,02	-1,08	4,59
SL1424	<i>opuCB</i>	Glycine betaine/carnitine/choline transport system permease protein opuCB	-1,00	-1,03	3,48
SL1437	<i>ydfJ</i>	Putative inner membrane metabolite transport protein ydfJ	-1,19	-1,35	4,11
SL1452	<i>sotB</i>	Probable sugar efflux transporter	1,14	1,36	-3,01
SL1472	<i>exuT</i>	Hexuronate transporter	-1,63	-1,16	3,48
SL1486	-	Uncharacterized Na(+)/H(+) antiporter HI_1107	1,17	-1,49	2,21
SL1507	<i>narU</i>	Nitrite extrusion protein 2	1,27	1,03	11,11
SL1533	<i>yncJ</i>	Uncharacterized protein yncJ	-4,14	1,63	-2,28
SL1543	<i>sgcB</i>	Putative phosphotransferase enzyme IIB component sgcB	1,16	1,24	2,02
SL1544	<i>sgcC</i>	Putative permease IIC component	1,24	1,20	2,09
SL1564	<i>yecS</i>	Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein yecS	-1,20	1,15	-2,41
SL1673	<i>oppF</i>	Oligopeptide transport ATP-binding protein oppF	1,18	1,00	2,57

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL1676	<i>oppB</i>	Oligopeptide transport system permease protein oppB	-1,10	-1,72	2,18
SL1677	<i>oppA</i>	Periplasmic oligopeptide-binding protein	-1,05	-1,22	3,54
SL1729	<i>cvrA</i>	Cell volume regulation protein A	-1,03	1,01	-2,77
SL1761	<i>manZ</i>	Mannose permease IID component	1,46	1,17	-2,11
SL1768	<i>yebO</i>	Uncharacterized protein yebO	-1,07	1,12	-3,12
SL1865	<i>ftnB</i>	Ferritin-like protein 2	1,16	1,07	3,10
SL1870	<i>tyrP</i>	Tyrosine-specific transport protein	1,44	1,12	-1,98
SL2119	<i>yegT</i>	Putative nucleoside transporter yegT	-1,23	-1,16	4,25
SL2165	<i>mgIC</i>	Galactoside transport system permease protein mgIC	1,03	-1,75	6,61
SL2166	<i>mgIA</i>	Galactose/methyl galactoside import ATP-binding protein MglA	-1,07	-1,75	11,23
SL2167	<i>mgIB</i>	D-galactose-binding periplasmic protein	1,09	-1,19	10,18
SL2175	<i>uhpC</i>	Regulatory protein uhpC	1,13	-1,03	2,60
SL2181	<i>fruA</i>	PTS system fructose-specific EIIBC component	1,17	1,23	-10,61
SL2183	<i>fruB</i>	Multiphosphoryl transfer protein	-1,06	-1,02	-6,16
SL2184	<i>setB</i>	Sugar efflux transporter B	-1,25	-1,03	-5,41
SL2243	<i>ttuB</i>	Putative tartrate transporter	1,05	-1,13	3,31
SL2311	<i>ulaA</i>	Ascorbate-specific permease IIC component ulaA	1,08	-1,02	2,27
SL2312	<i>ulaB</i>	putative sugar phosphotransferase component IIB	-1,02	-1,08	2,94
SL2313	<i>ulaC</i>	Ascorbate-specific phosphotransferase enzyme IIA component	-1,14	-1,17	3,39
SL2323	<i>hisJ</i>	Histidine-binding periplasmic protein	-1,05	-1,15	2,32
SL2324	<i>argT</i>	Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein	-1,15	1,01	7,89
SL2360	<i>fadL</i>	Long-chain fatty acid transport protein	-1,14	1,08	7,09
SL2367	<i>pgtP</i>	Phosphoglycerate transporter protein	1,36	1,62	2,39
SL2404	<i>cysA</i>	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA	1,55	1,39	12,67
SL2405	<i>cysW</i>	Sulfate transport system permease protein cysW	1,09	-1,12	6,01
SL2406	<i>cysU</i>	Sulfate transport system permease protein cysT	1,34	1,03	8,74
SL2407	<i>cysP</i>	Thiosulfate-binding protein	-1,07	-1,31	13,02
SL2522	<i>yjdL</i>	Probable dipeptide and tripeptide permease YjdL	1,00	1,05	-6,76
SL2532	<i>ybbF</i>	Putative PTS system EIIBC component ybbF	1,22	1,04	3,24
SL2609	<i>eamB</i>	Cysteine/O-acetylserine efflux protein	1,53	1,05	-7,15
SL2618	<i>kgtP</i>	Alpha-ketoglutarate permease	1,23	1,05	2,63
SL2759	<i>iroC</i>	Putative multidrug export ATP-binding/permease protein	1,36	1,74	-2,78
SL2760	<i>iroD</i>	Enterochelin esterase	1,04	-1,11	-2,90
SL2777	<i>gabP</i>	GABA permease	-1,46	-1,56	6,21
SL2814	<i>srlB</i>	Glucitol/sorbitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component	1,10	-1,54	-2,28
SL2892	<i>ygbN</i>	Uncharacterized permease HI_1015	1,20	-1,09	3,82
SL2943	<i>gudP</i>	Probable glucarate transporter	1,30	1,14	5,33
SL2950	<i>sdaC</i>	Serine transporter	-1,20	-1,09	2,59
SL2984	<i>ygdQ</i>	UPF0053 inner membrane protein ygdQ	-1,22	1,03	-4,13

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL2994	<i>araE</i>	Arabinose-proton symporter	1,49	1,34	4,71
SL3000	<i>yqeG</i>	Inner membrane transport protein yqeG	1,04	-1,02	-3,13
SL3041	<i>yggE</i>	Uncharacterized protein yggE	-1,05	1,12	-2,34
SL3050	<i>cbiO1</i>	Cobalt import ATP-binding protein CbiO 1	1,19	-1,37	2,22
SL3080	<i>yggM</i>	Uncharacterized protein yggM	1,70	-1,04	2,39
SL3088	<i>nupG</i>	Nucleoside permease nupG	1,14	1,19	2,45
SL3108	<i>exuT</i>	Hexuronate transporter	1,24	1,15	4,36
SL3132	<i>exbD</i>	Biopolymer transport protein exbD	1,20	1,13	-2,14
SL3133	<i>exbB</i>	Biopolymer transport protein exbB	1,04	1,15	-2,24
SL3143	<i>yiiZ</i>	Uncharacterized protein yiiZ	-1,25	-1,05	7,98
SL3144	-	C4-Dicarboxylate Transport System Permease Small Protein	-1,43	-1,29	6,19
SL3197	<i>alx</i>	Inner membrane protein alx	-1,24	-1,08	-2,21
SL3198	<i>sstT</i>	Serine/threonine transporter sstT	-1,05	1,04	2,88
SL3211	<i>yhaO</i>	Inner membrane transport protein yhaO	1,06	1,03	2,15
SL3228	<i>fruA</i>	PTS system fructose-specific EIIABC component	-1,11	-1,19	-2,11
SL3229	<i>fruB</i>	Multiphosphoryl transfer protein	-1,34	-1,41	-2,50
SL3232	<i>gatB</i>	Galactitol-specific phosphotransferase enzyme IIB component	-1,11	-1,16	2,08
SL3233	<i>gatC</i>	Galactitol permease IIC component	1,08	1,01	2,52
SL3252	<i>mtr</i>	Tryptophan-specific transport protein	-1,22	-1,07	-2,62
SL3284	<i>miaE</i>	Probable phospholipid ABC transporter permease protein miaE	-1,15	-1,10	-1,98
SL3294	<i>ptsN</i>	Nitrogen regulatory protein	1,19	1,06	2,57
SL3318	<i>yhcM</i>	Uncharacterized protein yhcM	-1,05	-1,10	-2,14
SL3324	<i>oadA</i>	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	1,21	-1,05	2,42
SL3376	<i>trkA</i>	Trk system potassium uptake protein trkA	1,04	-1,01	-2,57
SL3427	-	ABC Transporter ATPase	1,05	1,01	2,68
SL3440	<i>tsgA</i>	Protein tsgA	-1,26	1,12	-2,99
SL3443	<i>nirC</i>	Probable nitrite transporter	1,18	1,04	-5,91
SL3472	<i>feoA</i>	Ferrous iron transport protein A	-1,03	1,53	-3,17
SL3473	<i>feoB</i>	Ferrous iron transport protein B	-1,06	1,43	-3,20
SL3479	<i>gntT</i>	High-affinity gluconate transporter	1,06	-1,22	2,22
SL3520	<i>ugpC</i>	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC	1,20	-1,48	4,06
SL3521	<i>ugpE</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpE	1,12	-1,72	3,15
SL3522	<i>ugpA</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpA	1,32	-1,43	3,48
SL3523	<i>ugpB</i>	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein ugpB	1,27	1,10	12,09
SL3532	<i>livJ</i>	Leu/Ile/Val-binding protein	-1,06	1,01	2,72
SL3541	<i>zntA</i>	Lead, cadmium, zinc and mercury-transporting ATPase	-1,06	1,04	3,05
SL3552	<i>yhil</i>	Uncharacterized protein yhil	1,18	1,31	2,20
SL3557	<i>ntpB</i>	Dipeptide and tripeptide permease B	1,53	1,11	3,02
SL3564	<i>dcuB</i>	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter dcuB	1,27	-1,59	55,06
SL3579	<i>dctA</i>	C4-dicarboxylate transport protein	-1,06	-1,17	14,63



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL3638	<i>yiaO</i>	2,3-diketo-L-gulonate-binding periplasmic protein yiaO	1,36	1,16	4,21
SL3643	<i>yisR</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yisR	1,24	-1,19	4,41
SL3650	<i>mtlA</i>	PTS system mannitol-specific EIICBA component	1,02	-1,03	3,05
SL3662	<i>mdlA</i>	Mandelate racemase	1,18	1,01	4,34
SL3663	<i>gudP</i>	Probable glucarate transporter	1,43	1,22	4,44
SL3712	<i>gltS</i>	Sodium/glutamate symport carrier protein	1,44	1,03	5,98
SL3716	<i>yicJ</i>	Inner membrane symporter yicJ	1,23	-1,03	2,54
SL3750	<i>gatA</i>	PTS IIA-Like Nitrogen-Regulatory Protein PtsN	1,08	-1,01	1,99
SL3756	<i>uhpA</i>	Transcriptional regulatory protein uhpA	-1,11	1,19	-2,39
SL3758	<i>fucP</i>	L-fucose-proton symporter	1,25	-1,02	3,39
SL3767	-	Hypothetical	1,23	-1,00	2,32
SL3769	<i>dsdX</i>	DsdX permease	1,23	1,23	2,10
SL3774	<i>yidE</i>	Putative transport protein CKO_00031	1,42	1,43	5,60
SL3793	<i>dgoT</i>	D-galactonate transporter	1,67	1,10	2,84
SL3799	<i>gudP</i>	Probable glucarate transporter	-1,03	-1,11	4,70
SL3814	<i>mdtL</i>	Multidrug resistance protein mdtL	1,00	-1,06	-3,71
SL3827	<i>sgrR</i>	HTH-type transcriptional regulator sgrR	1,01	-1,23	2,56
SL3848	<i>rbsD</i>	D-ribose pyranase	-2,94	-1,06	-2,87
SL3849	<i>rbsA1</i>	Ribose import ATP-binding protein RbsA 1	-3,09	-1,10	-2,95
SL3851	<i>rbsB</i>	D-ribose-binding periplasmic protein	1,20	1,08	2,16
SL3906	<i>corA</i>	Magnesium transport protein corA	-1,33	1,07	-3,08
SL3963	<i>yihO</i>	Uncharacterized symporter yihO	1,17	-1,02	2,27
SL3964	<i>yihP</i>	Inner membrane symporter yihP	1,33	-1,13	2,70
SL4012	<i>sbp</i>	Sulfate-binding protein	1,43	1,13	3,15
SL4014	<i>yagG</i>	Uncharacterized symporter yagG	1,30	1,22	6,83
SL4018	-	Hypothetical	-1,08	1,22	-2,00
SL4022	<i>lsrR</i>	Transcriptional regulator lsrR	1,07	1,15	5,81
SL4023	<i>lsrA</i>	Autoinducer 2 import ATP-binding protein lsrA	-1,19	1,31	49,79
SL4024	<i>lsrC</i>	Autoinducer 2 import system permease protein lsrC	-1,24	-1,20	18,13
SL4025	<i>lsrD</i>	Autoinducer 2 import system permease protein lsrD	-1,14	-1,11	9,85
SL4036	<i>glpF</i>	Glycerol uptake facilitator protein	1,03	-1,01	2,43
SL4060	<i>ptsA</i>	Multiphosphoryl transfer protein 2	1,41	1,33	2,52
SL4061	<i>frwC</i>	Fructose-like permease IIC component 2	1,36	1,35	5,71
SL4062	<i>frwB</i>	Fructose-like phosphotransferase enzyme IIB component 2	1,36	1,10	3,40
SL4124	<i>yjbB</i>	Uncharacterized protein yjbB	1,09	1,02	2,28
SL4167	<i>malK</i>	Maltose+C3582/maltodextrin import ATP-binding protein MalK	-1,91	-2,04	1,67
SL4209	<i>actP</i>	Cation/acetate symporter ActP	-1,02	-1,45	13,02
SL4231	<i>adiC</i>	Arginine/agmatine antiporter	-1,10	-1,77	-4,64
SL4236	<i>melB</i>	Melibiose carrier protein	2,07	-1,79	1,46
SL4238	<i>dcuB</i>	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter dcuB	1,02	1,56	-11,02
SL4282	<i>yjeM</i>	Inner membrane transporter yjeM	-1,01	-1,06	-3,47

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Transport and binding proteins</b>					
SL4317	<i>ulaB</i>	Ascorbate-specific phosphotransferase enzyme IIB component	1,29	1,06	6,92
SL4318	<i>ulaC</i>	Ascorbate-specific phosphotransferase enzyme IIA component	1,14	-1,11	5,04
SL4351	<i>xyIE</i>	D-xylose-proton symporter	1,00	-1,60	7,99
SL4352	<i>xyIE</i>	D-xylose-proton symporter	1,12	1,12	2,71
SL4387	<i>mgtA</i>	Magnesium-transporting ATPase, P-type 1	-1,61	1,04	-2,08
SL4412	<i>idnT</i>	Gnt-II system L-idonate transporter	1,58	-1,02	3,38
SL4466	<i>manX</i>	PTS System Fructocific IIA Component	2,51	1,25	13,66
SL4467	<i>manX</i>	Probable phosphotransferase enzyme IIB component M6_Spy0801	1,80	-1,22	15,83
SL4468	<i>agaC</i>	N-acetylgalactosamine permease IIC component 1	2,23	-1,04	17,29
SL4469	<i>manZ</i>	Mannose permease IID component	2,24	1,09	14,20
<b>Unclassified</b>					
SL0512	<i>glxR</i>	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	1,60	-1,03	5,13
SL0598	<i>ynfl</i>	Cytoplasmic Chaperone rD Family Protein	1,33	1,02	-3,67
SL0638	<i>uxaA</i>	putative hydrolase C-terminus	1,24	-1,26	-5,57
SL0746	<i>citG</i>	2-(5"-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase	1,60	1,35	2,94
SL0762	<i>ybhE</i>	putative 3-carboxymuconate cyclase	1,19	1,08	2,28
SL1107	<i>mviN</i>	Virulence factor mviN	1,22	1,13	-2,09
SL1161	<i>sifA</i>	Secreted effector protein sifA	-15,51	-1,07	-3,57
SL1180	<i>msgA</i>	Virulence protein msgA	-1,13	1,20	-2,85
SL1182	<i>cspH</i>	Cold shock-like protein cspH	-1,05	1,31	-3,33
SL1183	<i>pagD</i>	Virulence protein pagD	-2,53	1,62	-6,00
SL1265	<i>nucA</i>	Nuclease	-2,21	1,00	-13,64
SL1291	<i>ydiF</i>	Uncharacterized protein ydiF	1,35	1,01	4,23
SL1318	<i>ttrC</i>	Tetrathionate Reductase Subunit C	1,05	1,47	-2,98
SL1320	<i>ttrS</i>	Sensor protein	1,42	1,12	2,21
SL1473	<i>pqaA</i>	PhoPQ-activated protein	-2,52	1,11	-3,72
SL1484	-	Coiled-Coil Protein	-1,18	-2,93	-1,44
SL1505	<i>smvA</i>	Methyl viologen resistance protein smvA	-1,22	-1,29	-2,99
SL1526	<i>srfC</i>	Virulence Factor	1,42	-1,05	2,39
SL1532	<i>sifB</i>	Secreted effector protein sifB	-6,21	1,85	-3,28
SL1561	<i>sseJ</i>	Secreted effector protein sseJ	-4,43	1,67	-2,52
SL1655	<i>trpD</i>	Anthranilate synthase component II	-1,04	1,09	2,35
SL1668	<i>tonB</i>	Protein tonB	1,07	1,31	-2,20
SL1894	<i>yedE</i>	UPF0394 inner membrane protein yedE	-1,04	-1,08	3,86
SL1895	<i>yedF</i>	UPF0033 protein yedF	1,16	1,05	3,15
SL2213	-	Hypothetical	1,16	-1,13	-2,23
SL2279	<i>menF</i>	Menaquinone-specific isochorismate synthase	-1,00	-1,05	-2,16
SL2284	<i>yfbK</i>	Uncharacterized protein yfbK	1,05	-1,11	-2,45
SL2758	<i>iroB</i>	putative glycosyltransferase	-1,39	1,54	-5,31
SL2770	<i>yflP</i>	UPF0065 protein yflP	-1,24	-1,43	3,01
SL2771	-	Hypothetical	-1,06	-1,07	4,00
SL2832	<i>hycB</i>	Formate hydrogenlyase subunit 2	-1,10	1,04	-4,92
SL2924	<i>sopD</i>	Secreted effector protein sopD	-1,52	1,19	-23,34

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Unclassified</b>					
SL2926	<i>cysI</i>	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component	1,12	-1,02	6,16
SL2942	<i>gudX</i>	Glucarate dehydratase-related protein	1,19	1,10	3,30
SL2996	<i>kdul</i>	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	-1,33	-1,48	3,46
SL3008	<i>stdA</i>	Uncharacterized fimbrial-like protein ybgD	1,50	1,10	2,60
SL3026	<i>yqfB</i>	UPF0267 protein yqfB	1,20	1,27	2,53
SL3128	-	Hypothetical	-1,27	1,12	-2,72
SL3145	<i>ygiK</i>	Uncharacterized protein ygiK	-1,14	-1,20	3,14
SL3796	<i>dgoK</i>	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	1,05	-1,14	2,37
SL3966	<i>yihR</i>	Uncharacterized protein yihR	1,04	-1,09	2,30
SL4338	<i>ytfJ</i>	Uncharacterized protein ytfJ	-1,19	1,16	2,51
SL4500	<i>yhcA</i>	Uncharacterized fimbrial chaperone yhcA	-1,65	-1,01	-1,99
<b>Unknown function</b>					
SL0005	<i>yaaA</i>	UPF0246 protein yaaA	1,04	1,17	-2,22
SL0042	<i>yicl</i>	Uncharacterized family 31 glucosidase ORF2	1,21	1,14	2,73
SL0081	<i>ygdI</i>	Uncharacterized lipoprotein ygdI	-1,38	1,04	-2,13
SL0161	<i>yacL</i>	UPF0231 protein yacL	1,28	1,31	2,93
SL0180	<i>yadE</i>	Uncharacterized protein yadE	-1,14	1,11	-2,44
SL0211	<i>cdaR</i>	Carbohydrate diacid regulator	-1,03	-1,04	4,32
SL0244	<i>yaeB</i>	UPF0066 protein yaeB	1,15	1,05	-2,27
SL0267	<i>sciH</i>	Hypothetical	1,22	1,04	3,82
SL0310	<i>ykfJ</i>	Uncharacterized protein ykfJ (pseudo)	-1,37	-1,03	-2,01
SL0365	<i>prpD</i>	2-methylcitrate dehydratase	1,05	-1,05	6,64
SL0372	<i>yaiW</i>	Uncharacterized protein yaiW	1,01	1,11	-2,53
SL0374	<i>yaiZ</i>	Uncharacterized protein yaiZ	1,39	1,18	2,44
SL0382	<i>yail</i>	UPF0178 protein yail	-1,15	-1,06	-2,28
SL0387	<i>rdgC</i>	Recombination-associated protein rdgC	1,02	-1,04	-2,81
SL0449	<i>queC</i>	7-cyano-7-deazaguanine synthase (putative aluminum resistance protein)	1,00	-1,01	-2,53
SL0450	<i>ybaE</i>	Uncharacterized protein ybaE	1,13	1,12	6,33
SL0519	<i>yIbA</i>	Uncharacterized protein yIbA	-1,04	-1,27	2,29
SL0523	<i>yIbE</i>	Uncharacterized protein yIbE	1,09	-1,20	3,61
SL0544	-	putative diguanylate cyclase/phosphodiesterase	-1,17	1,54	-2,09
SL0587	<i>ybdB</i>	Esterase ybdB	-1,13	-1,04	2,26
SL0589	<i>ybdD</i>	Uncharacterized protein ybdD	-1,21	-1,30	9,97
SL0592	<i>ybdM</i>	Uncharacterized protein ybdM	1,15	-1,04	2,44
SL0616	<i>pagP</i>	antimicrobial peptide resistance and lipid A acylation protein	-1,02	1,07	-6,65
SL0642	<i>ybeQ</i>	Uncharacterized protein ybeQ	1,10	1,13	2,20
SL0660	<i>ubiF</i>	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	1,46	1,20	2,78
SL0669	<i>ybfM</i>	Uncharacterized protein ybfM	-1,09	-1,10	2,74
SL0670	<i>ybfN</i>	Uncharacterized lipoprotein ybfN	1,01	-1,18	3,34

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Unknown function</b>					
SL0694	<i>ybgK</i>	Uncharacterized protein ybgK	1,17	-1,07	2,38
SL0711	<i>abrB</i>	Protein AbrB	1,38	1,17	2,71
SL0713	-	Hypothetical	-1,31	-1,16	3,77
SL0767	<i>hutU</i>	Urocanate hydratase	-1,11	-1,18	21,16
SL0776	<i>slrP</i>	E3 ubiquitin-protein ligase slrP	-1,49	-1,17	-6,12
SL0799	<i>ybiJ</i>	Uncharacterized protein ybiJ	-1,05	-1,01	-3,65
SL0841	<i>ybjG</i>	Putative undecaprenyl-diphosphatase ybjG	-1,08	1,12	-2,77
SL0876	<i>hcp</i>	Hydroxylamine reductase	1,05	1,23	2,63
SL0879	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,58	1,10	-5,97
SL0888	<i>ycaC</i>	Uncharacterized protein ycaC	1,10	1,07	2,29
SL0892	-	Inner Membrane Protein	1,14	1,22	-2,29
SL0912	<i>ycaO</i>	UPF0142 protein ycaO	-1,14	-1,04	-2,38
SL1012	<i>yccR</i>	putative DNA transformation protein	1,20	1,07	3,23
SL1018	<i>yccU</i>	Uncharacterized protein yccU	1,13	1,36	2,07
SL1049	<i>iraM</i>	Anti-adapter protein iraM	-1,15	1,06	-2,94
SL1068	<i>nanM</i>	N-acetylneuraminate epimerase	-1,44	-1,77	4,04
SL1083	<i>ymdA</i>	Uncharacterized protein ymdA	1,05	-1,09	3,20
SL1086	<i>mdoC</i>	Glucans biosynthesis protein C	1,21	1,22	-2,02
SL1103	<i>mdtH</i>	Multidrug resistance protein mdtH	1,13	1,19	-2,07
SL1105	<i>yceH</i>	UPF0502 protein yceH	1,32	1,25	3,95
SL1151	<i>bhsA</i>	Multiple stress resistance protein BhsA	1,06	1,26	-2,12
SL1204	<i>aroQ</i>	Monofunctional chorismate mutase	-2,19	1,16	-3,35
SL1216	<i>yeaL</i>	UPF0756 membrane protein yeaL	1,06	-1,06	-2,55
SL1218	<i>yeaJ</i>	Putative diguanylate cylase YeaJ	1,01	-1,01	-3,03
SL1226	<i>msrB</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase msrB	1,03	-1,04	2,56
SL1236	<i>nudG</i>	CTP pyrophosphohydrolase	-1,29	1,22	-2,76
SL1241	<i>astB</i>	N-succinylarginine dihydrolase	-1,35	-1,81	14,27
SL1242	<i>astE</i>	Succinylglutamate desuccinylase	-1,19	-2,02	8,31
SL1243	<i>spy</i>	Spheroplast protein Y	-1,08	1,19	2,21
SL1259	<i>yniA</i>	Uncharacterized protein yniA	1,23	1,38	3,45
SL1262	<i>ydiY</i>	Uncharacterized protein ydiY	-1,13	1,09	-3,05
SL1278	<i>cdgR</i>	Cyclic di-GMP regulator cdgR	-1,08	1,07	-2,05
SL1297	<i>ydiL</i>	Uncharacterized protein ydiL	1,38	1,15	-2,44
SL1303	<i>sufA</i>	Protein sufA	1,22	1,43	4,08
SL1304	<i>sufB</i>	FeS cluster assembly protein sufB	1,17	1,13	2,10
SL1309	<i>ynhG</i>	Probable L,D-transpeptidase YnhG	1,25	1,14	2,90
SL1391	<i>rnfA</i>	Electron transport complex protein rnfA	1,23	1,06	-2,32
SL1392	<i>ydgK</i>	Inner membrane protein ydgK	-1,11	-1,15	-2,54
SL1414	<i>ydgD</i>	Uncharacterized serine protease ydgD	1,06	1,04	2,11
SL1457	<i>yneE</i>	UPF0187 protein yneE	-1,08	1,01	-2,75
SL1475	<i>yhjG</i>	Uncharacterized aromatic compound monooxygenase yhjG	-1,14	-1,35	3,46
SL1494	<i>bdm</i>	Protein bdm homolog	-1,04	1,05	-4,02
SL1540	<i>ydck</i>	Uncharacterized acetyltransferase ydck	1,13	-1,14	2,24

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Unknown function</b>					
SL1554	<i>ycdJ</i>	Uncharacterized protein ycdJ	1,30	1,10	9,60
SL1559	<i>steB</i>	Secreted effector protein steB	-1,78	1,43	-16,75
SL1570	<i>ycdF</i>	Protein ycdF	1,23	1,09	2,05
SL1634	<i>yciR</i>	putative PAS/PAC domain protein	1,07	1,04	2,42
SL1659	<i>ymdF</i>	Uncharacterized protein ymdF	-1,55	1,10	-3,54
SL1661	<i>yciE</i>	Protein yciE	-1,42	1,25	-3,21
SL1702	<i>sirB2</i>	Protein sirB2	1,48	-1,03	-2,42
SL1737	<i>gns</i>	Protein gns	1,34	1,53	2,78
SL1749	<i>yeaZ</i>	M22 peptidase homolog yeaZ	-1,33	-1,49	-2,27
SL1762	<i>yobD</i>	UPF0266 membrane protein yobD	1,13	-1,35	-5,91
SL1763	<i>yebN</i>	UPF0059 membrane protein CKO_01156	1,08	-1,35	-2,84
SL1770	<i>yobH</i>	Uncharacterized protein yobH	-1,09	1,05	-2,58
SL1780	<i>yebV</i>	Uncharacterized protein yebV	-1,01	1,16	-2,02
SL1785	<i>ycgX</i>	Uncharacterized protein ycgX	-1,44	1,14	-6,12
SL1786	-	Hypothetical	1,03	1,09	-2,05
SL1821	<i>hexR</i>	HTH-type transcriptional regulator hexR	1,07	1,06	2,24
SL1878	<i>yecF</i>	Uncharacterized protein yecF	-1,09	1,13	-8,87
SL1977	<i>mtfA</i>	Protein mtfA	1,31	1,30	2,90
SL2037	<i>gyrI</i>	DNA gyrase inhibitory protein homolog	1,20	1,24	4,09
SL2112	<i>yegQ</i>	Uncharacterized protease yegQ	-1,03	1,12	-2,43
SL2120	<i>yegU</i>	Uncharacterized protein yegU	-1,16	-1,12	2,62
SL2130	<i>yehE</i>	Uncharacterized protein yehE	-1,84	-1,06	-15,13
SL2135	<i>yehS</i>	Uncharacterized protein yehS	1,04	-1,15	-2,30
SL2136	<i>yehT</i>	Uncharacterized response regulatory protein yehT	1,13	1,06	3,14
SL2158	<i>yohJ</i>	UPF0299 membrane protein CKO_00648	1,00	1,05	-11,34
SL2169	<i>yeiB</i>	Uncharacterized protein yeiB	-1,10	-1,00	-4,93
SL2179	<i>yeiH</i>	UPF0324 inner membrane protein yeiH	1,13	1,21	-2,57
SL2190	<i>yeiU</i>	Inner membrane protein yeiU	-1,14	1,09	-2,33
SL2258	<i>yfaU</i>	2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate aldolase	1,38	1,15	1,99
SL2305	<i>yfbV</i>	UPF0208 membrane protein yfbV	-1,17	-1,00	-2,12
SL2378	<i>yfeA</i>	Uncharacterized protein yfeA	-1,11	-1,04	-2,35
SL2432	<i>eutP</i>	Ethanolamine utilization protein eutP	-1,30	1,35	2,01
SL2439	<i>ypfG</i>	Uncharacterized protein ypfG	1,12	1,41	-2,79
SL2459	<i>hda</i>	DnaA-homolog protein hda	-1,01	1,00	-2,04
SL2506	<i>iscR</i>	HTH-type transcriptional regulator iscR	-1,38	1,03	-3,23
SL2515	<i>csiE</i>	Stationary phase-inducible protein csiE	1,24	1,36	6,85
SL2533	<i>murQ</i>	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	1,17	1,02	3,66
SL2538	<i>yfhL</i>	Uncharacterized ferredoxin-like protein yfhL	-1,32	1,11	-2,31
SL2630	<i>yfiN</i>	Probable diguanylate cyclase YfiN	-1,01	1,18	-2,63
SL2651	<i>corE</i>	putative cytochrome c-type biogenesis protein	-1,17	1,04	-2,45
SL2710	<i>yopC</i>	SPBc2 prophage-derived uncharacterized protein yopC	-1,34	-1,52	3,11
SL2740	<i>hxB</i>	3-hexulose-6-phosphate isomerase	1,22	-1,18	2,93
SL2764	<i>ybjX</i>	Uncharacterized protein ybjX	-1,45	1,10	-4,33
SL2773	<i>csiD</i>	Protein csiD	-1,27	-1,17	11,87

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Unknown function</b>					
SL2774	<i>ygaF</i>	Uncharacterized protein ygaF	-1,30	-1,54	9,95
SL2880	-	Hypothetical	-1,50	1,10	-2,45
SL2884	-	Hypothetical	1,38	1,30	6,08
SL2885	-	GCN5-Related N-Acetyltransferase	1,09	1,04	5,08
SL2946	<i>yqcC</i>	Uncharacterized protein yqcC	1,31	-1,09	-2,86
SL3048	-	Hypothetical	1,34	-1,23	3,16
SL3049	-	Permease Protein Of ABC-Type Cobalt Transporter	1,38	-1,21	2,71
SL3064	<i>yqgD</i>	Uncharacterized protein yqgD	-1,10	1,08	-4,69
SL3142	<i>ygiQ</i>	UPF0313 protein ygiQ	-1,38	1,18	-2,01
SL3163	<i>ygiD</i>	Uncharacterized protein ygiD	-2,08	1,12	-9,28
SL3176	<i>ygiM</i>	Uncharacterized protein ygiM	-1,23	1,09	-3,56
SL3196	<i>ygjR</i>	Uncharacterized oxidoreductase ygjR	1,34	1,05	2,00
SL3199	<i>yqiA</i>	Inner membrane protein yqiA	-1,37	1,17	-2,94
SL3200	<i>yqiB</i>	Uncharacterized protein yqiB	-1,21	1,17	-3,22
SL3209	<i>yhaL</i>	Hypothetical Protein yhaL	1,20	1,49	5,32
SL3222	<i>garL</i>	5-keto-4-deoxy-D-glucarate aldolase	1,27	1,19	2,25
SL3249	<i>yhbW</i>	Uncharacterized protein yhbW	-1,37	-1,38	2,08
SL3307	<i>yhcH</i>	Uncharacterized protein yhcH	1,60	1,04	2,30
SL3308	<i>nanK</i>	N-acetylmannosamine kinase	1,30	-1,18	2,02
SL3354	<i>yhdT</i>	Uncharacterized protein yhdT	1,09	1,17	-2,38
SL3411	<i>bfd</i>	Bacterioferritin-associated ferredoxin	-1,31	1,29	-4,45
SL3456	<i>yrfA</i>	Uncharacterized protein yrfA	-1,06	1,19	2,46
SL3471	<i>yhgF</i>	Protein yhgF	-1,23	2,01	-1,52
SL3484	<i>dinJ</i>	DNA-damage-inducible protein J	1,04	1,37	2,15
SL3497	<i>ttuB</i>	Putative tartrate transporter	1,09	1,05	2,60
SL3518	<i>yhhA</i>	Uncharacterized protein yhhA	1,13	1,56	2,39
SL3544	<i>yhhQ</i>	Inner membrane protein yhhQ	-1,29	1,01	-4,91
SL3561	<i>yhiR</i>	Uncharacterized protein yhiR	1,04	1,01	-2,11
SL3576	<i>yhjH</i>	Cyclic di-GMP phosphodiesterase YhjH	-1,44	1,20	-5,37
SL3609	<i>yiaC</i>	Uncharacterized N-acetyltransferase yiaC	1,15	-1,16	2,67
SL3628	<i>bax</i>	Protein bax	-1,39	1,03	-9,21
SL3637	<i>yiaN</i>	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transporter large permease protein yiaN	-1,05	-1,38	2,40
SL3644	-	Hypothetical	1,18	-1,02	4,20
SL3703	<i>ycbL</i>	Metallo-beta-lactamase L1	1,29	-1,10	2,03
SL3704	<i>yicG</i>	UPF0126 inner membrane protein yicG	1,20	1,15	-3,47
SL3711	-	Cytoplasmic Protein	1,50	-1,09	5,37
SL3714	<i>yicH</i>	Uncharacterized protein yicH	1,11	-1,08	2,92
SL3715	<i>yicI</i>	Alpha-xylosidase	1,25	1,16	1,98
SL3743	-	Hypothetical	1,50	1,54	3,57
SL3818	<i>purP</i>	Probable adenine permease PurP	-1,18	1,00	-2,73
SL3857	<i>yieP</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator yieP	1,21	-1,02	2,53
SL3955	<i>typA</i>	GTP-binding protein TypA/BipA	1,11	1,08	-2,44
SL3962	<i>ompL</i>	Porin ompL	1,29	-1,12	3,58
SL3967	<i>yihS</i>	Uncharacterized sugar isomerase yihS	1,06	-1,19	4,13
SL3979	<i>higB-2</i>	Toxin higB-2	-1,03	-1,15	2,12
SL4016	<i>yegU</i>	Uncharacterized protein yegU	1,37	1,16	4,60

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Unknown function</b>					
SL4034	<i>glpX</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2	-1,05	-1,50	2,09
SL4057	<i>yijF</i>	Uncharacterized protein yijF	1,33	-1,25	-8,02
SL4111	<i>zraP</i>	Zinc resistance-associated protein	1,57	1,64	-2,57
SL4162	<i>psiE</i>	Protein psiE	-1,22	1,16	-3,30
SL4191	-	Cytoplasmic Protein	-1,16	1,03	-2,80
SL4199	<i>yjcB</i>	Uncharacterized protein yjcB	-1,49	1,15	-9,86
SL4200	<i>yjcC</i>	Uncharacterized protein yjcC	-1,93	1,10	-3,42
SL4210	<i>yjch</i>	Inner membrane protein yjch	1,08	-1,46	39,97
SL4212	-	Hypothetical	-1,04	1,03	3,32
SL4249	-	Cytoplasmic Protein	-3,07	-2,48	-41,36
SL4253	-	Hypothetical	-1,44	1,09	-2,43
SL4281	<i>yjeA</i>	Uncharacterized protein YjeA	-1,18	-1,30	-2,31
SL4311	<i>yjfN</i>	Uncharacterized protein yjfN	1,41	1,24	6,64
SL4313	<i>yjfP</i>	Esterase yjfP	1,04	1,03	2,55
SL4315	<i>ulaG</i>	Probable L-ascorbate-6-phosphate lactonase ulaG	1,10	1,15	2,27
SL4329	<i>ytfB</i>	Uncharacterized protein ytfB	1,24	1,19	2,09
SL4385	<i>treB</i>	PTS system trehalose-specific EIIBC component	1,06	1,34	2,48
SL4431	-	UPF0386 protein KPN78578_02510	1,35	1,24	2,78
SL4451	-	Hypothetical	1,32	-1,32	2,30
SL4462	<i>yjiX</i>	Uncharacterized protein yjiX	-1,09	-1,08	-2,97
<b>Pathogenicity island</b>					
SL1026	<i>pipA</i>	Hypothetical	-1,63	1,10	-3,52
SL1027	<i>pipB</i>	Secreted effector protein pipB	-2,78	1,16	-16,02
SL1028	-	Inner Membrane Protein	-2,14	-1,05	-47,98
SL1029	<i>pipC</i>	cell invasion protein	-1,10	1,11	-8,91
SL1030	<i>sopB</i>	Inositol phosphate phosphatase sopB	-1,10	-1,03	-10,63
SL1323	<i>ybgA</i>	Uncharacterized protein ybgA	1,18	1,12	2,23
SL1324	<i>mlrA</i>	HTH-type transcriptional regulator mlrA	-1,84	-1,14	-2,75
SL1325	<i>ssrB</i>	putative two-component response regulator	-2,38	1,26	-2,58
SL1326	<i>spiR</i>	Sensor kinase protein	-3,42	-1,01	-2,56
SL1327	<i>spiC</i>	Salmonella pathogenicity island protein C	-7,40	1,89	-7,03
SL1328	<i>spiA</i>	Yop proteins translocation protein C	-8,81	1,31	-6,06
SL1329	<i>ssaD</i>	Type-III Secretion Protein	-5,18	-1,04	-7,92
SL1330	-	Secretion System Protein	-4,91	1,17	-4,88
SL1331	<i>sseA</i>	Type III secretion system chaperone sseA	-7,73	1,49	-3,08
SL1332	<i>sseB</i>	Secreted effector protein sseB	-6,60	1,31	-2,69
SL1333	<i>sscA</i>	Type III Secretion Low Calcium Response Chaperone LcrH/SycD	-5,68	1,13	-2,44
SL1334	<i>sseC</i>	Secreted effector protein sseC	-6,74	1,15	-2,37
SL1335	<i>sseD</i>	Secreted effector protein sseD	-5,29	1,33	-1,44
SL1336	<i>sseE</i>	Secreted Effector Protein	-4,59	1,21	-1,28
SL1337	<i>sscB</i>	Type III Secretion Chaperone	-5,73	1,14	-1,55
SL1338	<i>sseF</i>	Hypothetical	-2,64	-1,03	-1,30
SL1339	<i>sseG</i>	Hypothetical	-2,53	-1,17	-1,36
SL1340	<i>ssaG</i>	Secretion System Apparatus SsaG	-4,80	1,60	-1,67
SL1341	<i>ssaH</i>	Hypothetical	-14,29	1,75	-18,14
SL1342	<i>ssaI</i>	Type III Secretion System Apparatus Protein	-14,52	1,76	-22,27

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Pathogenicity island</b>					
SL1343	<i>ssaJ</i>	Secretion system apparatus lipoprotein ssaJ	-15,99	1,46	-17,00
SL1344	-	Type III Secretion Apparatus	-11,83	1,31	-16,48
SL1345	<i>ssaK</i>	Secretion system apparatus protein ssaK	-11,43	1,32	-11,64
SL1346	<i>ssaL</i>	Secretion system apparatus protein ssaL	-8,55	1,37	-5,60
SL1347	<i>ssaM</i>	Secretion system apparatus protein ssaM	-8,23	1,24	-5,75
SL1348	<i>ssaV</i>	Secretion system apparatus protein ssaV	-2,98	1,24	-1,41
SL1349	<i>ssaN</i>	Probable secretion system apparatus ATP synthase ssaN	-3,19	1,27	1,14
SL1350	<i>ssaO</i>	Secretion system apparatus protein ssaO	-3,52	1,44	1,32
SL1351	<i>ssaP</i>	Secretion system apparatus protein ssaP	-2,62	1,21	-1,05
SL1352	<i>ssaQ</i>	Secretion system apparatus protein SsaQ	-2,23	1,24	1,11
SL1353	<i>yscR</i>	Virulence protein yscR	-8,10	1,79	-4,01
SL1354	<i>ssaS</i>	Secretion system apparatus protein SsaS	-11,20	1,36	-6,62
SL1355	<i>ssaT</i>	Secretion system apparatus protein ssaT	-4,96	1,26	-4,28
SL2844	<i>sitD</i>	Probable iron transport system membrane protein HI_0359	-1,18	-1,12	-3,87
SL2845	<i>yopJ</i>	Effector protein yopJ	-1,36	-1,29	-5,48
SL2846	<i>sprB</i>	AraC family transcriptional regulator	-1,39	-1,66	-14,85
SL2847	<i>sirC</i>	Transcriptional regulator sirC	-1,41	-1,61	-10,80
SL2848	-	Hypothetical	-1,56	-1,22	-20,93
SL2849	<i>orgB</i>	Oxygen-regulated invasion protein orgB	-1,44	-1,20	-9,10
SL2850	<i>orgA</i>	Oxygen-regulated invasion protein orgA	-1,49	-1,26	-21,71
SL2851	<i>prgK</i>	Lipoprotein prgK	-1,30	-1,14	-8,73
SL2852	<i>prgJ</i>	Protein prgJ	-1,22	-1,08	-8,23
SL2853	<i>prgI</i>	Protein prgI	-1,13	-1,02	-4,71
SL2854	<i>prgH</i>	Protein prgH	-1,36	1,09	-18,46
SL2855	<i>hilD</i>	Transcriptional regulator hilD	-1,39	-1,07	-5,63
SL2856	<i>hilA</i>	Transcriptional regulator hilA	-1,26	-1,38	-10,34
SL2857	<i>iagB</i>	Invasion protein iagB	-1,27	-1,07	-7,09
SL2858	<i>sptP</i>	Secreted effector protein sptP	-1,24	-1,03	-5,53
SL2859	<i>sicP</i>	Chaperone protein sicP	-1,35	-1,14	-8,37
SL2860	<i>iacP</i>	Probable acyl carrier protein iacP	-1,30	-1,10	-21,34
SL2861	<i>sipA</i>	Cell invasion protein sipA	-1,25	-1,06	-15,35
SL2862	<i>sipD</i>	Cell invasion protein sipD	-1,13	1,02	-18,49
SL2863	<i>sipC</i>	Cell invasion protein sipC	-1,10	1,01	-6,21
SL2864	<i>sipB</i>	Cell invasion protein sipB	-1,11	1,03	-7,20
SL2865	<i>sicA</i>	Chaperone protein sicA	-1,10	1,09	-8,04
SL2866	<i>spaS</i>	Surface presentation of antigens protein spaS	-1,42	-1,39	-21,68
SL2867	<i>spaR</i>	Surface presentation of antigens protein spaR	-1,55	-1,58	-22,12
SL2868	<i>spaQ</i>	Surface presentation of antigens protein SpaQ	-1,54	-1,38	-32,11
SL2869	<i>spaP</i>	Surface presentation of antigens protein spaP	-1,68	-1,43	-29,30
SL2870	<i>spaO</i>	Surface presentation of antigens protein SpaO	-1,28	-1,25	-14,14
SL2871	<i>spaN</i>	Surface presentation of antigens protein spaN	-1,17	-1,10	-9,31
SL2872	<i>spaM</i>	Surface presentation of antigens protein spaM	-1,29	-1,40	-10,63
SL2873	<i>spaL</i>	Probable ATP synthase spaL	-1,29	-1,41	-10,53
SL2874	<i>spaK</i>	Surface presentation of antigens protein spaK	-1,15	-1,03	-6,61
SL2875	<i>invA</i>	Invasion protein invA	-1,27	-1,01	-12,89
SL2876	<i>invE</i>	Invasion protein invE	-1,30	-1,14	-20,75



**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Pathogenicity island</b>					
SL2877	<i>invG</i>	Protein invG	-1,17	-1,02	-8,31
SL2878	<i>invF</i>	Invasion protein invF	-1,17	1,06	-8,31
SL2879	<i>invH</i>	Invasion lipoprotein invH	-1,50	-1,13	-10,98
SL3728	<i>mgtB</i>	Magnesium-transporting ATPase, P-type 1	-1,69	1,21	-4,80
SL3729	<i>mgtC</i>	Protein mgtC	-1,98	1,06	-24,09
SL4193	<i>siiA</i>	Hypothetical	-2,30	-1,86	-26,54
SL4194	<i>siiB</i>	Integral Membrane Protein	-2,14	-1,76	-26,23
SL4195	<i>siiC</i>	Outer membrane protein tolC	-2,10	-1,38	-22,66
SL4196	<i>siiD</i>	Proteases secretion protein prtE	-1,96	-1,42	-31,87
SL4197	<i>siiiE</i>	Hypothetical	-1,31	1,08	-18,80
SL4198	<i>siiF</i>	Leukotoxin translocation ATP-binding protein lktB	-2,25	-1,23	-46,89
<b>Bacteriophages</b>					
SL0948	<i>ydaE</i>	Hypothetical	-2,04	-1,32	-1,12
SL0949	-	Hypothetical	-2,04	-1,24	-2,03
SL0951	<i>C1</i>	Gifsy-2 Prophage CI Protein	-1,47	1,16	-2,19
SL0952	<i>ydaU</i>	Gifsy-2 replication Protein O	-2,00	-1,28	-1,62
SL0963	-	Bacteriophage Protein	-1,44	-1,22	-2,18
SL0965	<i>gtgA</i>	putative bacteriophage encoded virulence protein	-1,87	-1,12	-2,25
SL0966	<i>nucD</i>	Probable lysozyme from lambdoid prophage DLP12	-1,77	-1,04	-3,53
SL0967	<i>rzpD</i>	Putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12	-2,04	-1,37	-4,10
SL0968	-	Hypothetical	-2,15	-1,28	-3,14
SL0969	-	Phage Terminase Large Subunit	-1,39	-1,38	-2,08
SL0973	-	putative RecA/RadA recombinase	-2,06	-1,33	-2,53
SL0974	-	ATP-binding sugartransporter-like protein	-1,91	-1,39	-2,39
SL0975	-	Minor Tail Protein Z-Like	-1,91	-1,36	-2,19
SL0979	-	Minor Tail Protein	-1,52	-1,14	-2,27
SL0984	-	Phage Minor Tail Protein L	-1,39	-1,24	-2,05
SL0987	-	Hocificity Protein J	-1,70	-1,15	-2,37
SL0988	<i>stfQ</i>	Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Qin	-1,78	-1,55	-2,71
SL0989	<i>ycdD</i>	Tail fiber assembly protein homolog from lambdoid prophage Fels-1	-1,94	-1,45	-3,53
SL0990	-	Hypothetical (pseudo)	-2,79	-1,68	-6,38
SL0993	<i>yedK</i>	Uncharacterized protein yedK (gtgD)	-1,37	-1,07	-1,98
SL0994	-	Hypothetical	-1,83	-1,71	-3,96
SL0995	<i>gtgE</i>	Prophage Encoded Virulence Factor	-2,02	-1,28	-1,84
SL0996	<i>msgA</i>	Virulence protein msgA (gtgF)	-1,48	-1,02	-5,56
SL1784	<i>sopE2</i>	Guanine nucleotide exchange factor sopE2	-1,51	1,15	-16,49
SL1793	<i>pagO</i>	Protein pagO	-1,97	1,23	-5,37
SL1799	<i>pagK</i>	bacteriophage encoded pagK (phoPQ-activated protein)	-2,12	1,45	-4,28
SL1928	-	Cytoplasmic Protein	-5,33	1,56	-7,81
SL1933	<i>ymfP</i>	Putative protein ymfP	-1,57	-1,19	-1,99
SL1942	-	Hypothetical	-1,72	-1,22	-2,95
SL1943	-	Hypothetical	-1,68	-1,15	-2,74
SL1944	-	Hypothetical	-1,59	-1,10	-2,55

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Bacteriophages</b>					
SL1945	-	Hypothetical	-1,56	-1,07	-2,73
SL1946	-	Hypothetical	-1,66	-1,10	-2,68
SL1949	<i>yfmO</i>	Putative uncharacterized protein yfmO	-1,45	-1,07	-2,59
SL1950	<i>yfmN</i>	Uncharacterized protein yfmN	-1,38	-1,14	-3,34
SL1951	-	P27 Family Phage Terminase Small Subunit	-1,56	-1,17	-3,72
SL1952	-	Hypothetical	-1,58	-1,12	-3,08
SL1953	-	Hypothetical Protein SL1953	-1,40	-1,02	-2,20
SL1955	<i>rzpD</i>	Putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12	-1,36	-1,16	-3,37
SL1956	-	Uncharacterized protein HI_1415	-1,45	-1,11	-3,36
SL1957	-	Phage Holin Lambda Family	-1,42	-1,12	-3,53
SL1961	-	Hypothetical	-1,00	1,06	2,40
SL1962	<i>yfdM</i>	Putative uncharacterized protein yfdM	-1,19	-1,23	2,13
SL1963	<i>yfdN</i>	Uncharacterized protein yfdN	-1,14	-1,13	2,23
SL1964	<i>yfdO</i>	Hypothetical	-1,30	-1,23	2,05
SL1968	<i>yfdP</i>	Uncharacterized protein yfdP	-1,03	1,04	2,99
SL1969	<i>yfdQ</i>	Uncharacterized protein yfdQ	-1,17	-1,09	3,27
SL1970	<i>yfdR</i>	Uncharacterized protein yfdR	-1,20	-1,18	2,48
SL1971	-	Hypothetical	-1,18	-1,23	2,22
SL1972	-	Hypothetical	-1,10	-1,10	2,63
SL1973	-	Hypothetical	1,03	-1,30	2,66
SL1975	-	Phage Protein	-1,23	-1,25	2,00
SL2546	<i>gogB</i>	Hypothetical	-1,55	-1,09	-2,58
SL2548	-	Hypothetical Protein SL2548	-1,50	-1,10	-3,48
SL2549	-	PagK-Like Protein	-2,08	1,46	-4,10
SL2550	<i>ycdD</i>	Tail fiber assembly protein homolog from lambdoid prophage Fels-1	-2,76	-1,35	-4,98
SL2551	-	Appr-1-P Processing Domain-Containing Protein	-2,46	-1,34	-4,76
SL2552	<i>stfQ</i>	Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Qin	-1,74	-1,12	-3,35
SL2553	-	Hocificity Protein J	-2,46	-1,12	-11,08
SL2554	-	Phage Tail Assembly Protein	-1,31	-1,13	-2,08
SL2555	-	NLP/P60 Protein	-1,80	-1,35	-3,95
SL2556	-	Phage Minor Tail Protein L	-1,54	-1,16	-2,63
SL2557	-	Minor Tail Protein	-1,77	-1,25	-2,28
SL2558	-	Hypothetical	-1,46	-1,20	-2,18
SL2559	-	Minor Tail Protein	-1,81	-1,02	-4,83
SL2560	-	Minor Tail Component Of Putative Prophage	-2,14	-1,10	-5,25
SL2561	-	Tail Protein V	-1,60	1,04	-2,80
SL2562	-	Minor Tail Protein U	-1,71	-1,09	-2,81
SL2563	<i>gipA</i>	Putative transposase in <i>snaA-snaB</i> intergenic region	-1,48	1,01	-2,39
SL2564	-	Phage Tail Component	-1,67	-1,02	-3,00
SL2565	-	Tail Attachment Protein	-2,08	-1,12	-2,67
SL2566	-	DNA Packaging-Like Protein	-1,95	-1,02	-3,76
SL2567	-	P21 prophage-derived major head protein	-1,99	-1,10	-4,91
SL2568	-	Head Decoration Protein	-1,94	-1,06	-4,48
SL2569	<i>sppA</i>	Putative signal peptide peptidase sppA	-2,37	-1,11	-10,71

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Bacteriophages</b>					
SL2570	-	Lambda Family Phage Portal Protein	-2,15	-1,13	-6,06
SL2571	-	Lambda prophage-derived head-to-tail joining protein W	-2,13	-1,13	-2,93
SL2572	<i>tfaD</i>	Putative tail fiber assembly protein homolog from lambdoid prophage DLP12	-2,40	-1,07	-4,71
SL2573	<i>nohA</i>	P21 prophage-derived terminase small subunit	-2,45	-1,05	-8,60
SL2575	<i>rzpD</i>	Putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12	-2,15	-1,02	-5,68
SL2576	<i>arrD</i>	Probable lysozyme from lambdoid prophage DLP12	-1,78	-1,03	-3,56
SL2576	<i>arrD</i>	Probable lysozyme from lambdoid prophage DLP12	-1,78	-1,03	-3,56
SL2577	-	Hypothetical	-1,85	-1,13	-2,26
SL2578	-	Hypothetical	1,66	1,60	2,10
SL2583	-	Hypothetical	1,01	1,10	2,16
SL2592	-	Gifsy-1 Prophage CI Protein	-1,28	1,28	-2,12
SL2596	-	Hypothetical	-1,72	-1,01	-2,41
SL2597	<i>recE</i>	Exodeoxyribonuclease 8	-1,33	1,01	-2,59
SL2673	<i>pinE</i>	DNA-invertase from lambdoid prophage e14	-1,32	1,11	-3,80
SL2674	<i>sopE</i>	Guanine nucleotide exchange factor sopE	-1,33	-1,03	-27,69
SL2676	-	Hypothetical	1,16	1,09	1,99
SL2695	<i>smf</i>	Protein smf	-1,04	-1,23	2,11
SL2696	-	Hypothetical	-1,12	-1,39	3,87
SL2697	-	Hypothetical	-1,30	-1,61	-2,19
SL2703	<i>ybil</i>	Hypothetical (similar a P2p38)	-2,29	-1,54	-1,69
SL2704	-	Putative uncharacterized protein ORFC-like in prophage region	-3,07	-1,35	-3,46
SL2709	<i>xerD</i>	Tyrosine recombinase xerD	-1,14	-1,37	2,01
SL2712	<i>intA</i>	Prophage CP4-57 integrase	-1,10	-1,19	2,48
SL2713	-	Hypothetical	-1,41	-2,00	1,55
SL2715	-	Hypothetical Protein SL2715	1,01	-1,13	2,19
SL2719	-	Hypothetical	1,01	-1,31	3,69
SL2720	-	Hypothetical	1,12	-1,38	3,04
SL2721	-	P4 prophage-derived uncharacterized protein t2655	1,33	-1,17	2,87
SL2722	<i>traC</i>	DNA primase traC	1,07	-1,27	4,29
SL2723	<i>intA</i>	Prophage CP4-57 integrase	1,26	1,78	6,56
SL2724	<i>intA</i>	Integrase	1,18	1,34	3,40
SL4131	-	Hypothetical	1,02	-1,17	-4,83
SL4134	-	Cytoplasmic Protein	-1,01	-1,23	2,11
SL4140	<i>gtrB</i>	Sfil prophage-derived bactoprenol glucosyl transferase	-1,15	1,03	-2,31
SL4142	-	Phage Baseplate Assembly Protein V	1,32	1,09	3,49
SL4143	-	Late Control D Family Protein	1,23	-1,09	2,56
SL4144	-	Bacteriophage Tail Fibre Protein	1,42	1,06	2,50
SL4145	-	Hypothetical	1,19	-1,01	2,10
SL4146	-	Phage Tail Protein	1,06	-1,16	2,84
SL4147	-	Hypothetical	1,02	1,02	2,44

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b><i>cob/pdu operon</i></b>					
SL1993	<i>cobS</i>	Cobalamin synthase	-1,01	-1,29	-2,17
SL2006	<i>cbiT</i>	Probable cobalt-precorrin-6Y C(15)-methyltransferase [decarboxylating]	1,08	1,11	-2,83
SL2007	<i>cbiE</i>	Probable cobalt-precorrin-6Y C(5)-methyltransferase	1,12	-1,05	-3,51
SL2008	<i>cbiD</i>	Putative cobalt-precorrin-6A synthase [deacetylating]	1,22	1,23	-2,77
SL2009	<i>cbiC</i>	Cobalt-precorrin-8X methylmutase	1,01	1,01	-2,23
SL2010	<i>cbiB</i>	Cobalamin biosynthesis protein <i>cbiB</i>	1,02	1,05	-3,16
SL2013	<i>pduF</i>	Propanediol diffusion facilitator	1,29	1,42	-3,03
SL2014	<i>pduA</i>	Propanediol utilization protein <i>pduA</i>	-1,43	1,42	-22,81
SL2015	<i>pduB</i>	Propanediol utilization protein <i>pduB</i>	-1,67	1,17	-40,16
SL2017	<i>pduD</i>	Propanediol dehydratase medium subunit	-1,57	-1,14	-38,60
SL2018	<i>pduE</i>	Propanediol dehydratase small subunit	-1,75	-1,25	-66,46
SL2019	<i>pduG</i>	propanediol utilization protein	-1,77	-1,18	-53,01
SL2020	<i>pduH</i>	propanediol utilization protein	-1,85	-1,16	-77,87
SL2021	<i>pduJ</i>	propanediol utilization protein	-1,69	-1,19	-20,95
SL2022	<i>pduK</i>	propanediol utilization protein	-1,67	-1,31	-18,88
SL2023	<i>pduL</i>	propanediol utilization protein	-2,00	-1,44	-25,45
SL2024	<i>pduM</i>	propanediol utilization protein	-1,98	-1,30	-26,37
SL2025	<i>pduN</i>	propanediol utilization protein	-1,73	-1,23	-20,64
SL2026	<i>pduO</i>	propanediol utilization protein	-1,80	-1,25	-21,04
SL2027	<i>pduP</i>	putative CoA-dependent proprionaldehyde dehydrogenase	-1,52	-1,18	-8,20
SL2028	<i>pduQ</i>	putative propanol dehydrogenase	-1,56	-1,41	-9,36
SL2029	<i>pduS</i>	propanediol utilization ferredoxin	-1,93	-1,59	-4,59
SL2030	<i>pduT</i>	putative propanediol utilization protein	-1,28	-1,28	-3,61
SL2031	<i>pduU</i>	putative propanediol utilization protein <i>PduU</i>	-1,53	-1,36	-4,09
SL2032	<i>pduV</i>	putative propanediol utilization protein <i>PduV</i>	-1,75	-1,80	-3,98
SL2033	<i>pduW</i>	Acetokinase	-1,52	-1,24	-3,31
SL2034	<i>pduX</i>	putative propanediol utilization protein	1,42	1,08	-2,41
<b>Plasmids</b>					
SLP1_0013	<i>traQ</i>	Protein <i>traQ</i>	1,07	-1,04	2,12
SLP1_0022	<i>traC</i>	Protein <i>traC</i>	1,31	-1,11	2,12
SLP1_0025	<i>traV</i>	Protein <i>TraV</i>	1,03	-1,17	2,31
SLP1_0026	<i>trbD</i>	Conjugal Transfer Protein <i>TrbD</i>	1,16	1,24	2,84
SLP1_0039	<i>yubM</i>	Uncharacterized protein <i>yubM</i>	-1,01	-1,02	2,75
SLP1_0043	-	Hypothetical	1,34	1,21	2,35
SLP1_0057	-	Cytoplasmic Protein	1,14	-1,02	2,77
SLP1_0058	-	Uncharacterized protein pSLT049	1,01	-1,09	2,85
SLP1_0059	-	Myosin Heavy Chain Gizzard Smooth	-1,00	1,14	2,65
SLP1_0065	-	Insertion element IS630 uncharacterized 39 kDa protein	1,15	1,14	-2,02
SLP1_0067	<i>spvA</i>	28.1 kDa virulence protein	-1,35	1,10	-6,22
SLP1_0068	<i>spvB</i>	65 kDa virulence protein	-1,39	1,03	-12,28
SLP1_0069	<i>spvC</i>	27.5 kDa virulence protein	-1,59	-1,30	-34,55
SLP1_0070	<i>spvD</i>	Virulence protein <i>vsdE</i>	-1,34	-1,34	-10,27
SLP1_0077	-	Cytoplasmic Protein	-1,01	-1,14	2,14

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	gene	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Plasmids</b>					
SLP1_0054	<i>parB</i>	Plasmid Partition par B protein	1,09	1,12	5,19
SLP1_0055	<i>parA</i>	Plasmid partition protein A	-1,14	-1,37	5,75
SLP1_0079	<i>ccdB</i>	Cytotoxic protein CcdB	-1,01	-1,01	2,35
SLP1_0080	<i>ccdA</i>	Protein CcdA	1,08	1,02	2,95
SLP1_0086	<i>papB</i>	Major pilu subunit operon regulatory protein papB	1,95	2,29	-1,65
SLP1_0087	<i>fedA</i>	F107 fimbrial protein	1,31	1,36	2,72
SLP1_0096	<i>pagC</i>	Virulence membrane protein pagC	1,40	1,04	2,84
SLP2_0003	-	Hypothetical	1,01	1,12	4,59
SLP2_0004	-	Addiction Module Antitoxin	1,09	1,15	3,55
SLP2_0005	<i>dnaQ</i>	Uncharacterized protein pSLT049	1,03	1,28	4,21
SLP2_0006	-	viria25	1,03	1,12	1,99
SLP2_0009	-	Hypothetical	-1,52	-1,18	2,29
SLP2_0011	-	Uncharacterized protein in cib 5'region	1,10	1,08	5,04
SLP2_0012	<i>cib</i>	Colicin-Ib	1,33	1,46	4,20
SLP2_0015	-	Hypothetical	-1,09	-1,09	2,04
SLP2_0016	-	Hypothetical	-1,09	-1,31	2,65
SLP2_0017	<i>resD</i>	Resolvase	-1,24	-1,45	2,37
SLP2_0020	-	Hypothetical	-1,03	-1,12	2,26
SLP2_0029	<i>yubF</i>	Uncharacterized protein yubF	1,32	1,06	2,34
SLP2_0030	-	Uncharacterized protein yubG	1,40	1,39	2,83
SLP2_0031	<i>yubH</i>	Uncharacterized protein yubH	-1,04	-1,23	2,24
SLP2_0032	<i>yubl</i>	Putative antirestriction protein Yubl	1,27	1,21	3,00
SLP2_0033	<i>yubJ</i>	Uncharacterized protein yubJ	1,06	1,04	3,01
SLP2_0036	<i>yubM</i>	Uncharacterized protein yubM	1,09	1,12	2,51
SLP2_0037	<i>psiB</i>	Protein psiB	1,24	1,17	4,39
SLP2_0038	<i>psiA</i>	Protein psiA	1,23	1,09	5,34
SLP2_0039	-	Hypothetical	1,36	1,11	4,78
SLP2_0044	<i>yfcl</i>	Uncharacterized protein pSLT051	1,09	1,07	2,09
SLP2_0063	-	Hypothetical	1,03	1,08	-2,42
SLP2_0064	-	TraQ Protein	1,13	1,18	-2,04
SLP2_0078	-	Hypothetical	1,48	1,07	3,93
SLP2_0079	-	Hypothetical	1,29	1,13	3,02
SLP2_0086	-	Prepilin Peptidase	-1,08	-1,21	-3,05
SLP2_0087	<i>pbl</i>	Peptidoglycan-binding-like protein	1,09	1,03	-2,03
SLP3_0001	<i>sulll</i>	Dihydropteroate synthase type-2	1,09	1,00	-2,14
SLP3_0004	<i>repA</i>	Regulatory protein repA	1,20	1,20	2,05
SLP3_0005	-	Hypothetical Protein SLP3_0005	1,08	1,10	2,21
SLP3_0006	-	Hypothetical Protein SLP3_0006	1,15	1,23	2,23
SLP3_0007	<i>mobA</i>	Mobilization protein A	1,27	1,09	2,75
SLP3_0008	<i>mobA</i>	Mobilization protein A	1,39	1,26	2,71
SLP3_0009	<i>mobB</i>	Mobilization protein B	1,30	1,14	2,64
SLP3_0011	<i>mobC</i>	Mobilization protein C	1,12	1,04	3,03
<b>Not found</b>					
SL1178	-	Hypothetical Protein SL1178	-2,75	1,66	-7,87
SL1399	-	Hypothetical Protein SL1399	1,53	1,02	7,56
SL2766	-	Hypothetical	-1,47	1,04	-2,82
SL3742	-		1,26	-1,01	-4,69

**Tabla suplementaria 3**

Genes afectados en las cepas mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*, con un FC entre 2 y -2, organizados por categorías funcionales

ID	<i>gene</i>	Description	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
		<b>Not found</b>			
SL4165	-	Hypothetical Protein SL4165	-1,19	-1,46	2,30



**Tabla suplementaria 4**

Genes de la categoría HGT afectados en las mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*

ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Gifsy-2</b>					<b>SPI-2</b>				
SL0948	<i>ydaE</i>	-2,04	-1,32	-1,12	SL1334	<i>sseC</i>	-6,74	1,31	-2,37
SL0949	-	-2,04	-1,24	-2,03	SL1335	<i>sseD</i>	-5,29	1,24	-1,44
SL0951	<i>C1</i>	-1,47	1,16	-2,19	SL1336	<i>sseE</i>	-4,59	1,21	-1,28
SL0952	<i>ydaU</i>	-2,00	-1,28	-1,62	SL1337	<i>sscB</i>	-5,73	1,37	-1,55
SL0963	-	-1,44	-1,22	-2,18	SL1338	<i>sseF</i>	-2,64	1,44	-1,30
SL0965	<i>gtgA</i>	-1,87	-1,12	-2,25	SL1339	<i>sseG</i>	-2,53	1,27	-1,36
SL0966	<i>nucD</i>	-1,77	-1,04	-3,53	SL1340	<i>ssaG</i>	-4,80	1,32	-1,67
SL0967	<i>rzpD</i>	-2,04	-1,37	-4,10	SL1341	<i>ssaH</i>	-14,29	1,26	-18,14
SL0968	-	-2,15	-1,28	-3,14	SL1342	<i>ssaI</i>	-14,52	-1,14	-22,27
SL0969	-	-1,39	-1,38	-2,08	SL1343	<i>ssaJ</i>	-15,99	-1,01	-17,00
SL0973	-	-2,06	-1,33	-2,53	SL1344	-	-11,83	1,89	-16,48
SL0974	-	-1,91	-1,39	-2,39	SL1345	<i>ssaK</i>	-11,43	1,31	-11,64
SL0975	-	-1,91	-1,36	-2,19	SL1346	<i>ssaL</i>	-8,55	1,15	-5,60
SL0978	-	-1,50	-1,12	-1,76	SL1347	<i>ssaM</i>	-8,23	1,13	-5,75
SL0979	-	-1,52	-1,14	-2,27	SL1348	<i>ssaV</i>	-2,98	1,24	-1,41
SL0984	-	-1,39	-1,24	-2,05	SL1349	<i>ssaN</i>	-3,19	1,26	1,14
SL0987	-	-1,70	-1,15	-2,37	SL1350	<i>ssaO</i>	-3,52	-1,02	1,32
SL0988	<i>stfQ</i>	-1,78	-1,55	-2,71	SL1351	<i>ssaP</i>	-2,62	1,79	-1,05
SL0989	<i>ycdD</i>	-1,94	-1,45	-3,53	SL1352	<i>ssaQ</i>	-2,23	1,36	1,11
SL0990	-	-2,79	-1,68	-6,38	SL1353	<i>yscR</i>	-8,10	1,14	-4,01
SL0993	<i>yedK</i>	-1,37	-1,07	-1,98	SL1354	<i>ssaS</i>	-11,20	1,49	-6,62
SL0994	-	-1,83	-1,71	-3,96	SL1355	<i>ssaT</i>	-4,96	1,21	-4,28
SL0995	<i>gtgE</i>	-2,02	-1,28	-1,84	<b>Bacteriophage SLP203</b>				
SL0996	<i>msgA</i>	-1,48	-1,02	-5,56	SL1928	-	-5,33	1,56	-7,81
<b>SPI-5</b>					SL1933	<i>ymfP</i>	-1,57	-1,19	-1,99
SL1026	<i>pipA</i>	-1,63	1,10	-3,52	SL1942	-	-1,72	-1,22	-2,95
SL1027	<i>pipB</i>	-2,78	1,16	-16,02	SL1943	-	-1,68	-1,15	-2,74
SL1028	-	-2,14	-1,05	-47,98	SL1944	-	-1,59	-1,10	-2,55
SL1029	<i>pipC</i>	-1,10	1,11	-8,91	SL1945	-	-1,56	-1,07	-2,73
SL1030	<i>sopB</i>	-1,10	-1,03	-10,63	SL1946	-	-1,66	-1,10	-2,68
<b>SPI-2</b>					SL1949	<i>ymfO</i>	-1,45	-1,07	-2,59
SL1323	<i>ybgA</i>	1,18	1,12	2,23	SL1950	<i>ymfN</i>	-1,38	-1,14	-3,34
SL1324	<i>mlrA</i>	-1,84	-1,17	-2,75	SL1951	-	-1,56	-1,17	-3,72
SL1325	<i>ssrB</i>	-2,38	1,75	-2,58	SL1952	-	-1,58	-1,12	-3,08
SL1326	<i>spiR</i>	-3,42	1,76	-2,56	SL1953	-	-1,40	-1,02	-2,20
SL1327	<i>spiC</i>	-7,40	1,17	-7,03	SL1955	<i>rzpD</i>	-1,36	-1,16	-3,37
SL1328	<i>spiA</i>	-8,81	1,31	-6,06	SL1956	-	-1,45	-1,11	-3,36
SL1329	<i>ssaD</i>	-5,18	-1,04	-7,92	SL1957	-	-1,42	-1,12	-3,53
SL1330	-	-4,91	1,33	-4,88	SL1961	-	-1,00	1,06	2,40
SL1331	<i>sseA</i>	-7,73	-1,03	-3,08	SL1962	<i>yfdM</i>	-1,19	-1,23	2,13
SL1332	<i>sseB</i>	-6,60	1,60	-2,69	SL1963	<i>yfdN</i>	-1,14	-1,13	2,23
SL1333	<i>sscA</i>	-5,68	1,46	-2,44	SL1964	<i>yfdO</i>	-1,30	-1,23	2,05



**Tabla suplementaria 4**

Genes de la categoría HGT afectados en las mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*

ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Bacteriophage SLP203</b>					<b>Gifsy-1</b>				
SL1968	<i>yfdP</i>	-1,03	1,04	2,99	SL2546	<i>gogB</i>	-1,55	-1,09	-2,58
SL1969	<i>yfdQ</i>	-1,17	-1,09	3,27	SL2548	-	-1,50	-1,10	-3,48
SL1970	<i>yfdR</i>	-1,20	-1,18	2,48	SL2549	-	-2,08	1,46	-4,10
SL1971	-	-1,18	-1,23	2,22	SL2550	<i>ycdD</i>	-2,76	-1,35	-4,98
SL1972	-	-1,10	-1,10	2,63	SL2551	-	-2,46	-1,34	-4,76
SL1973	-	1,03	-1,30	2,66	SL2552	<i>stfQ</i>	-1,74	-1,12	-3,35
SL1975	-	-1,23	-1,25	2,00	SL2553	-	-2,46	-1,12	-11,08
<b><i>cob/pdu</i> operon</b>					SL2554	-	-1,31	-1,13	-2,08
SL1993	<i>cobS</i>	-1,01	-1,29	-2,17	SL2555	-	-1,80	-1,35	-3,95
SL2006	<i>cbiT</i>	1,08	1,11	-2,83	SL2556	-	-1,54	-1,16	-2,63
SL2007	<i>cbiE</i>	1,12	-1,05	-3,51	SL2557	-	-1,77	-1,25	-2,28
SL2008	<i>cbiD</i>	1,22	1,23	-2,77	SL2558	-	-1,46	-1,20	-2,18
SL2009	<i>cbiC</i>	1,01	1,01	-2,23	SL2559	-	-1,81	-1,02	-4,83
SL2010	<i>cbiB</i>	1,02	1,05	-3,16	SL2560	-	-2,14	-1,10	-5,25
SL2013	<i>pduF</i>	1,29	1,42	-3,03	SL2561	-	-1,60	1,04	-2,80
SL2014	<i>pduA</i>	-1,43	1,42	-22,81	SL2562	-	-1,71	-1,09	-2,81
SL2015	<i>pduB</i>	-1,67	1,17	-40,16	SL2563	<i>gipA</i>	-1,48	1,01	-2,39
SL2016	<i>pduC</i>	-1,47	-1,07	-24,41	SL2564	-	-1,67	-1,02	-3,00
SL2017	<i>pduD</i>	-1,57	-1,14	-38,60	SL2565	-	-2,08	-1,12	-2,67
SL2018	<i>pduE</i>	-1,75	-1,25	-66,46	SL2566	-	-1,95	-1,02	-3,76
SL2019	<i>pduG</i>	-1,77	-1,18	-53,01	SL2567	-	-1,99	-1,10	-4,91
SL2020	<i>pduH</i>	-1,85	-1,16	-77,87	SL2568	-	-1,94	-1,06	-4,48
SL2021	<i>pduJ</i>	-1,69	-1,19	-20,95	SL2569	<i>sppA</i>	-2,37	-1,11	-10,71
SL2022	<i>pduK</i>	-1,67	-1,31	-18,88	SL2570	-	-2,15	-1,13	-6,06
SL2023	<i>pduL</i>	-2,00	-1,44	-25,45	SL2571	-	-2,13	-1,13	-2,93
SL2024	<i>pduM</i>	-1,98	-1,30	-26,37	SL2572	<i>tfaD</i>	-2,40	-1,07	-4,71
SL2025	<i>pduN</i>	-1,73	-1,23	-20,64	SL2573	<i>nohA</i>	-2,45	-1,05	-8,60
SL2026	<i>pduO</i>	-1,80	-1,25	-21,04	SL2575	<i>rzpD</i>	-2,15	-1,02	-5,68
SL2027	<i>pduP</i>	-1,52	-1,18	-8,20	SL2576	<i>arrD</i>	-1,78	-1,03	-3,56
SL2028	<i>pduQ</i>	-1,56	-1,41	-9,36	SL2577	-	-1,85	-1,13	-2,26
SL2029	<i>pduS</i>	-1,93	-1,59	-4,59	SL2578	-	1,66	1,60	2,10
SL2030	<i>pduT</i>	-1,28	-1,28	-3,61	SL2583	-	1,01	1,10	2,16
SL2031	<i>pduU</i>	-1,53	-1,36	-4,09	SL2592	-	-1,28	1,28	-2,12
SL2032	<i>pduV</i>	-1,75	-1,80	-3,98	SL2596	-	-1,72	-1,01	-2,41
SL2033	<i>pduW</i>	-1,52	-1,24	-3,31	SL2597	<i>recE</i>	-1,33	1,01	-2,59
SL2034	<i>pduX</i>	1,42	1,08	-2,41					

**Tabla suplementaria 4**

Genes de la categoría HGT afectados en las mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*

ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>Fels-2</b>					<b>SPI-1</b>				
SL2673	<i>pinE</i>	-1,32	1,11	-3,80	SL2867	<i>spaR</i>	-1,55	-1,58	-22,12
SL2674	<i>sopE</i>	-1,33	-1,03	-27,69	SL2868	<i>spaQ</i>	-1,54	-1,38	-32,11
SL2676	-	1,16	1,09	1,99	SL2869	<i>spaP</i>	-1,68	-1,43	-29,30
SL2695	<i>smf</i>	-1,04	-1,23	2,11	SL2870	<i>spaO</i>	-1,28	-1,25	-14,14
SL2696	-	-1,12	-1,39	3,87	SL2871	<i>spaN</i>	-1,17	-1,10	-9,31
SL2697	-	-1,30	-1,61	-2,19	SL2872	<i>spaM</i>	-1,29	-1,40	-10,63
SL2703	<i>ybil</i>	-2,29	-1,54	-1,69	SL2873	<i>spaL</i>	-1,29	-1,41	-10,53
SL2704	-	-3,07	-1,35	-3,46	SL2874	<i>spaK</i>	-1,15	-1,03	-6,61
SL2709	<i>xerD</i>	-1,14	-1,37	2,01	SL2875	<i>invA</i>	-1,27	-1,01	-12,89
<b>Fels-1</b>					SL2876	<i>invE</i>	-1,30	-1,14	-20,75
SL2712	<i>intA</i>	-1,10	-1,19	2,48	SL2877	<i>invG</i>	-1,17	-1,02	-8,31
SL2713	-	-1,41	-2,00	1,55	SL2878	<i>invF</i>	-1,17	1,06	-8,31
SL2715	-	1,01	-1,13	2,19	SL2879	<i>invH</i>	-1,50	-1,13	-10,98
SL2719	-	1,01	-1,31	3,69	<b>SPI-3</b>				
SL2720	-	1,12	-1,38	3,04	SL3728	<i>mgtB</i>	-1,69	1,21	-4,80
SL2721	-	1,33	-1,17	2,87	SL3729	<i>mgtC</i>	-1,98	1,06	-24,09
SL2722	<i>traC</i>	1,07	-1,27	4,29	<b>Prophage remain inactive</b>				
SL2723	<i>intA</i>	1,26	1,78	6,56	SL4131	-	1,02	-1,17	-4,83
SL2724	<i>intA</i>	1,18	1,34	3,40	SL4134	-	-1,01	-1,23	2,11
<b>SPI-1</b>					SL4140	<i>gtrB</i>	-1,15	1,03	-2,31
SL2844	<i>sitD</i>	-1,18	-1,12	-3,87	SL4142	-	1,32	1,09	3,49
SL2845	<i>yopJ</i>	-1,36	-1,29	-5,48	SL4143	-	1,23	-1,09	2,56
SL2846	<i>sprB</i>	-1,39	-1,66	-14,85	SL4144	-	1,42	1,06	2,50
SL2847	<i>sirC</i>	-1,41	-1,61	-10,80	SL4145	-	1,19	-1,01	2,10
SL2848	-	-1,56	-1,22	-20,93	SL4146	-	1,06	-1,16	2,84
SL2849	<i>orgB</i>	-1,44	-1,20	-9,10	SL4147	-	1,02	1,02	2,44
SL2850	<i>orgA</i>	-1,49	-1,26	-21,71	<b>SPI-4</b>				
SL2851	<i>prgK</i>	-1,30	-1,14	-8,73	SL4193	<i>siiA</i>	-2,30	-1,86	-26,54
SL2852	<i>prgJ</i>	-1,22	-1,08	-8,23	SL4194	<i>siiB</i>	-2,14	-1,76	-26,23
SL2853	<i>prgI</i>	-1,13	-1,02	-4,71	SL4195	<i>siiC</i>	-2,10	-1,38	-22,66
SL2854	<i>prgH</i>	-1,36	1,09	-18,46	SL4196	<i>siiD</i>	-1,96	-1,42	-31,87
SL2855	<i>hilD</i>	-1,39	-1,07	-5,63	SL4197	<i>siiiE</i>	-1,31	1,08	-18,80
SL2856	<i>hilA</i>	-1,26	-1,38	-10,34	SL4198	<i>siiF</i>	-2,25	-1,23	-46,89
SL2857	<i>iagB</i>	-1,27	-1,07	-7,09	<b>pSLT</b>				
SL2858	<i>sptP</i>	-1,24	-1,03	-5,53	SLP1_0013	<i>traQ</i>	1,07	-1,04	2,12
SL2859	<i>sicP</i>	-1,35	-1,14	-8,37	SLP1_0022	<i>traC</i>	1,31	-1,11	2,12
SL2860	<i>iacP</i>	-1,30	-1,10	-21,34	SLP1_0025	<i>traV</i>	1,03	-1,17	2,31
SL2861	<i>sipA</i>	-1,25	-1,06	-15,35	SLP1_0026	<i>trbD</i>	1,16	1,24	2,84
SL2862	<i>sipD</i>	-1,13	1,02	-18,49	SLP1_0039	<i>yubM</i>	-1,01	-1,02	2,75
SL2863	<i>sipC</i>	-1,10	1,01	-6,21	SLP1_0043	-	1,34	1,21	2,35
SL2864	<i>sipB</i>	-1,11	1,03	-7,20	SLP1_0054	<i>parB</i>	1,09	1,12	5,19
SL2865	<i>sicA</i>	-1,10	1,09	-8,04	SLP1_0055	<i>parA</i>	-1,14	-1,37	5,75
SL2866	<i>spaS</i>	-1,42	-1,39	-21,68	SLP1_0057	-	1,14	-1,02	2,77

**Tabla suplementaria 4**

Genes de la categoría HGT afectados en las mutantes *greA*, *greB* y *greAgreB*

ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT	ID	gene	<i>greA</i> vs WT	<i>greB</i> vs WT	<i>greAgreB</i> vs WT
<b>pSLT</b>					<b>pSRF1010</b>				
SLP1_0058	-	1,01	-1,09	2,85	SLP3_0001	<i>sullI</i>	1,09	1,00	-2,14
SLP1_0059	-	-1,00	1,14	2,65	SLP3_0004	<i>repA</i>	1,20	1,20	2,05
SLP1_0065	<i>spvR</i>	1,15	1,14	-2,02	SLP3_0005	-	1,08	1,10	2,21
SLP1_0067	<i>spvA</i>	-1,35	1,10	-6,22	SLP3_0006	-	1,15	1,23	2,23
SLP1_0068	<i>spvB</i>	-1,39	1,03	-12,28	SLP3_0007	<i>mobA</i>	1,27	1,09	2,75
SLP1_0069	<i>spvC</i>	-1,59	-1,30	-34,55	SLP3_0008	<i>mobA</i>	1,39	1,26	2,71
SLP1_0070	<i>spvC</i>	-1,34	-1,34	-10,27	SLP3_0009	<i>mobB</i>	1,30	1,14	2,64
SLP1_0077	-	-1,01	-1,14	2,14	SLP3_0011	<i>mobC</i>	1,12	1,04	3,03
SLP1_0079	<i>ccdB</i>	-1,01	-1,01	2,35					
SLP1_0080	<i>ccdA</i>	1,08	1,02	2,95					
SLP1_0086	<i>papB</i>	1,95	2,29	-1,65					
SLP1_0087	<i>fedA</i>	1,31	1,36	2,72					
SLP1_0096	<i>pagC</i>	1,40	1,04	2,84					
<b>pCOL1B</b>									
SLP2_0003	<i>yacA</i>	1,01	1,12	4,59					
SLP2_0004	<i>yacB</i>	1,09	1,15	3,55					
SLP2_0005	<i>yacC</i>	1,03	1,28	4,21					
SLP2_0006	<i>yadA</i>	1,03	1,12	1,99					
SLP2_0009	<i>yafA</i>	-1,52	-1,18	2,29					
SLP2_0011	<i>yagA</i>	1,10	1,08	5,04					
SLP2_0012	<i>cib</i>	1,33	1,46	4,20					
SLP2_0015	<i>ybbA</i>	-1,09	-1,09	2,04					
SLP2_0016	<i>ybfA</i>	-1,09	-1,31	2,65					
SLP2_0017	<i>resD</i>	-1,24	-1,45	2,37					
SLP2_0020	-	-1,03	-1,12	2,26					
SLP2_0029	<i>yubF</i>	1,32	1,06	2,34					
SLP2_0030	-	1,40	1,39	2,83					
SLP2_0031	<i>yubH</i>	-1,04	-1,23	2,24					
SLP2_0032	<i>yubl</i>	1,27	1,21	3,00					
SLP2_0033	<i>yubJ</i>	1,06	1,04	3,01					
SLP2_0036	<i>yubM</i>	1,09	1,12	2,51					
SLP2_0037	<i>psiB</i>	1,24	1,17	4,39					
SLP2_0038	<i>psiA</i>	1,23	1,09	5,34					
SLP2_0039	-	1,36	1,11	4,78					
SLP2_0044	<i>yfcl</i>	1,09	1,07	2,09					
SLP2_0063	-	1,03	1,08	-2,42					
SLP2_0064	-	1,13	1,18	-2,04					
SLP2_0078	<i>traF</i>	1,48	1,07	3,93					
SLP2_0079	<i>traE</i>	1,29	1,13	3,02					
SLP2_0086	<i>pilU</i>	-1,08	-1,21	-3,05					
SLP2_0087	<i>pbl</i>	1,09	1,03	-2,03					