

CAPITULO VI

Marcadores genéticos de patogenicidad en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Tania Gaviria Cantin*

<https://orcid.org/0000-0001-7837-3390>

Carlos Balsalobre Parra**

<https://orcid.org/0000-0002-4147-219X>

Abstract. The genus Salmonella is composed of Gram-negative, non-spore-forming, rod-shaped bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family. Salmonella has important relevance at public health level since it is one of the main enteric pathogens in both developed and developing countries. In this chapter, we describe the different genetic markers of pathogenicity of Salmonella enterica serovar Typhimurium (S. Typhimurium), which in humans causes salmonellosis, gastroenteritis characterized by inflammatory diarrhea, usually originated after the ingestion of contaminated food or water. In Colombia, S. Typhimurium is the most prevalent serovar. The last report of the National Health Institute showed that, of the 23 serovar incidents in the country, serovar Typhimurium represents 30% of the total isolations made between 1997 and 2016. The role of the the main Salmonella virulence-associated genes are described in this

* Université de Namur
Namur, Belgique
✉ tania-cristina.gaviria@unamur.be

** Universidad de Barcelona
Barcelona, España
✉ cbalsalobre@ub.edu

Cita este capítulo

Gaviria Cantin T, Balsalobre Parra C. Marcadores genéticos de patogenicidad en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 185-216.

review. The virulence genes of S. Typhimurium are mostly located within islands of pathogenicity (SPI). The best studied SPI is the so called SPI-1. The genes encoded in SPI-1 promote the invasion of eukaryotic cells, whose regulation is mediated by the HilA protein encoded in the gene, hilA, present in the same SPI-1. HilA activates the expression of the genes that code for the synthesis of a type 3 secretion system (T3SS) responsible for secreting and injecting effector proteins into the host cell. The expression of hilA is under the control of a regulation loop, comprised of the HilD, HilC and RtsA proteins. HilD is the predominant regulator of this system, while HilC and RtsA are in charge of amplifying the activation signal. On the other hand, the genes contained in SPI-2 are implicated in causing systemic infections and the intracellular proliferation of the bacteria. The role of other genetic elements involved in Salmonella infectious process is also discussed.

Resumen. El género *Salmonella* está compuesto de bacterias Gram-negativas, no esporuladas, en forma de bacilo. *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. En este capítulo, se describen los diferentes marcadores genéticos de patogenicidad de *Salmonella* enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), que en humanos causa salmonelosis, gastroenteritis caracterizada por diarrea inflamatoria, originada normalmente tras la ingestión de alimentos o agua contaminados. En Colombia, *S. Typhimurium* es el serovar más prevalente. El último reporte del Instituto Nacional de Salud mostró que, de los 23 serovares incidentes en el país, el serovar *Typhimurium* representa el 30% del total de los aislamientos que se realizaron entre los años 1997 y 2016. El papel principal de los genes asociados a la virulencia de *Salmonella* será descrito en esta revisión. Los genes de virulencia de *S. Typhimurium* están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI). Los genes codificados en la SPI-1 promueven la invasión de células eucariotas, cuya regulación está mediada por la proteína HilA codificada en el gen, hilA, presente en la misma SPI-1. HilA activa la expresión de los genes que codifican para la síntesis de un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) encargado de secretar e inyectar proteínas efectoras dentro de la célula hospedadora. La expresión de hilA se

encuentra bajo el control de un bucle de regulación, comprendido por las proteínas HilD, HilC y RtsA. HilD es el regulador predominante de este sistema, mientras que HilC y RtsA se encargan de amplificar la señal de activación. Por su parte, los genes que contiene la SPI-2, están implicados en causar infecciones sistémicas y la proliferación intracelular de la bacteria. El papel de otros elementos involucrados en la infección por *Salmonella* también será discutido.

Palabras clave: *S. Typhimurium*, SPI, *hilA*, invasión, T3SS-1

Introducción

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 μm , con una longitud de 2 a 5 μm , son aerobios facultativos y son motiles mediante flagelación peritrica [1,2]. 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 H_2S , son ureasas negativos, no desaminan fenilalanina, y son tetrionato reductasas [3].

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* [4]. En la subespecie *enterica* se encuentran la mayoría de los serovares causantes de enfermedades en humanos y animales domésticos [4,5]. 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 [6].

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 [7,8]. En Colombia, *S. Typhimurium* es el serovar más prevalente. El último informe del Instituto Nacional de Salud mostró que, de los 23 serovares incidentes en el país, el serovar Typhimurium representa el 30% del total de los aislamientos que se realizaron entre los años 1997 y 2016.

En humanos *S. Typhimurium* causa salmonelosis 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*) [9]. 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 [10,11]. El paso de la bacteria a través de la pared intestinal se cree que es por transcitosis, 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 [12]. 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 [13].

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 [14]. Algunas cepas, como la SL1344 utilizada ampliamente en investigación, también contiene los plásmidos pCol1B9 [15] y pRSF1010 [15, 16]. *Salmonella* contiene profagos funcionales: Gifsy 1 y 2, conocidos por jugar un papel durante la invasión celular; Fels-1 y 2, SopE Φ , entre otros [17]. En la Figura 1 se encuentra resumida la estructura del genoma de *S. Typhimurium* de la cepa SL1344.

En el genoma de *S. Typhimurium* hay un elevado número de genes que codifican para factores de virulencia necesarios durante el proceso infeccioso. Estos genes de virulencia están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI, del inglés *Salmonella pathogenicity island*). Un número elevado de SPI's ha sido identificado en diferentes aislamientos de *Salmonella*. Cinco SPI (SPI1-5) se encuentran más ampliamente distribuidas, 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 [18]. 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) [19-21]. Además, también se encuentran genes de virulencia en otras localizaciones concretas del cromosoma, como profagos y el plásmido pSLT.

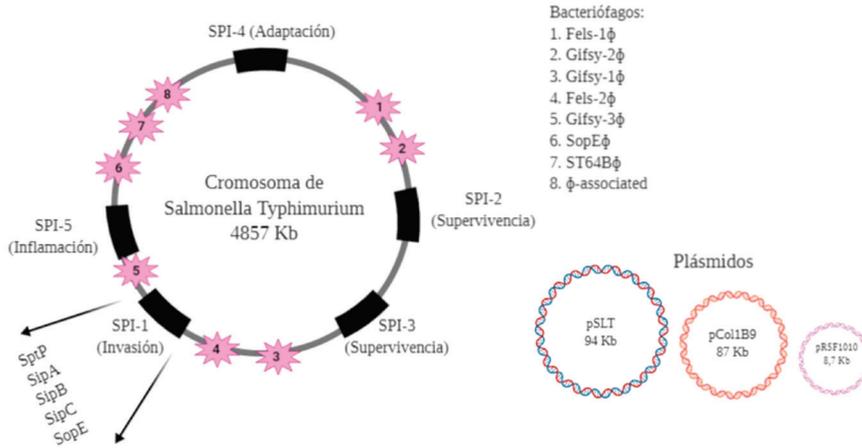


Figura 1. Estructura del genoma del *S. Typhimurium* (SL1344). Un cromosoma y tres plásmidos. En el cromosoma se representan las cinco islas de patogenicidad con su respectiva función entre paréntesis; y los ocho profagos. Fuente: Elaboración propia.

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 *fhlA* y *mutS*, tiene un 42% de G-C y no se encuentra asociada a un gen ARNt [22]. 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 [22]. 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 [20]. 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 directamente al citoplasma [23, 24].

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

El T3SS presente en *Salmonella* se caracteriza 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 [19]. 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. Se han identificado al menos trece 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 [26]. 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 codificado en la SPI-1 se encuentra en la tabla 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*. Estas proteínas se unen a la actina y promueven su polimerización,

facilitando la reordenación del citoesqueleto y, en definitiva, el proceso de invasión [27-30]. SipA contiene dos dominios funcionales: la región N-terminal que interviene en el transporte a través del T3SS y el dominio C-terminal o “*actin binding*” que se encarga del ensamblaje de la actina F [31]. 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 [32]. 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 [33]. 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 [27, 30, 34]. También se ha demostrado que SipC podría estar modulando el ensamblaje y/o función del translocón [27]. Así, la actividad combinada de SipA y SipC promueve la formación de filamentos de actina cerca de las bacterias adheridas, y estabiliza estos filamentos contra los mecanismos de inhibición de las proteínas de la célula hospedadora [35].

-SopE y SopE2

SopE, codificada en el fago críptico SopEΦ, está presente únicamente en algunas cepas de *S. Typhimurium* como SL1344 [36]. SopE2 que muestra una identidad del 69% con SopE, está codificada por el gen *sopE2* conservado y presente en cepas patógenas de *Salmonella* [37]. Ambas son proteínas efectoras secretadas vía T3SS 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. Proteínas secretadas a través del T3SS codificado en la SPI-1-1

Proteína	Función	Referencia
AvrA	Inhibe la apoptosis en células epiteliales y la piroptosis en macrófagos.	[38, 39]
SipA	Media la invasión de células epiteliales induciendo la polimerización de actina.	[32, 35]
SipB	Media la adhesión a las células epiteliales, piroptosis temprana de macrófagos y autofagia de macrófagos.	[11, 40]
SipC	Media la adhesión a las células epiteliales, la agrupación y nucleación de la actina.	[11, 30]
SipD	Media la adhesión a las células epiteliales.	[11, 41]
SptP	Activadora de GTPasas (Rac y Cdc42) y tirosina fosfatasa.	[42-44]
SopA	Estimula la transmigración de leucocitos polimorfonucleares.	[45]
SopB/SigD	Induce la respuesta proinflamatoria. Media el reordenamiento del citoesqueleto de actina, la invasión de las células epiteliales y la formación SCV.	[46-48]
SopD	Promueve la acumulación de fluidos en la infección intestinal.	[49]
SopE y SopE2	Median la invasión promoviendo el ondulamiento de la membrana y el reordenamiento del citoesqueleto de actina.	[36, 50]
SlrP	Necesaria en la virulencia de ratones.	[51]
SspH1	Necesaria en la virulencia de vacas.	[52]

Fuente: Elaboración propia

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 [53]. 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*) [54, 55]. 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 [56]. 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 [57-59]. 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 [59, 60]. 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 [61, 62]. 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 [62]. 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, ARN^{tPheU}. 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* [56]. 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

[56]. 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. La acción combinada de los tres activadores puede amplificar la señal y actuar como un “interruptor” de la transcripción de *hilA* [24]. 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* [62, 63]. 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 [64].

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* [65-67]. 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 [62].

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 nucleoide 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* [61, 67, 68]. 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 [68]. Por ello, Boddicker et al. [69] 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* [61]. 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/XyIS [68]. 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 [24, 58]. En un estudio reciente de Petrone et al. [70], 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, seis ya habían sido descritas, cuatro en la SPI-1 (*hilC*, *hilD*, *hilA* e *invF/invR*) y dos fuera de ella (*siiA* y *rtsA*). De las 11 nuevas dianas descritas, 9 de ellas están localizadas fuera de la SPI-1. 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* [71, 72].

A parte de los tres 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* [73]. 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 [69]. La sobreexpresión de HilE reprime de manera importante la transcripción de *invF*, pero de manera independiente de *hilA* [73].

Se ha establecido una correlación entre la expresión de FliZ y los reguladores de la SPI-1. FliZ afecta post-traduccionalmente al activador FlhD₄C₂, 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 [74]. Se ha descrito que FliZ afecta HilD de manera positiva [75]. 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 [75].

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 [76]. Ellermeier et al. [56] 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 [77]. PhoQ, es un sensor quinasa, que fosforila el activador transcripcional PhoP en respuesta a bajos niveles de cationes extracelulares [78]. 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 [79]. 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* [80].

Isla de patogenicidad 2 (SPI-2)

La SPI-2 también contiene unas 40 kb y está insertada al lado de *valV*, gen que codifica el ARN^{tVal}. 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 tetratoato 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 [82]. Este segmento de función no relacionada con virulencia no se muestra en la Figura 1. La porción mayor de 25,3 kb con un contenido de G-C del 43%, está presente únicamente en *S. enterica*, 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 encuentran aquellos que codifican para un segundo T3SS, que denominamos T3SS-2 para diferenciarlo del codificado en la SPI-1 (T-SS-1). Se ha descrito que mutantes carentes de SPI-2, muestran dificultad para invadir cultivos de células epiteliales o macrófagos [83].

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir de la siguiente manera:

- *ssa* (*secretion system apparatus*): representados por *ssaB-E* y *ssaG-V*, cuyos productos conforman el T3SS-2 [84, 85].
- *ssc* (*secretion system chaperone*): codifican las proteínas SscA y SscB [86].
- *sse* (*secretion system effector*), representados por los genes *sseA-sseG*. [86].
- *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 [87]. 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 [88, 89]. 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 [85, 90, 91].

De manera interesante, HilD es necesaria para la expresión de *ssrAB*. Bustamante et al. [92] 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. [93] 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 se produce la interacción funcional entre HilD y HNS previniendo la represión ejercida por H-NS sobre el operón *ssrAB*.

Otras islas de patogenicidad

Como ya se comentó, existen cinco SPIs ampliamente distribuidas entre los aislamientos de *S. enterica*. Si bien, las dos primeras son las más estudiadas a continuación se detallan algunas características de las restantes SPIs.

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee de 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 *selC*. Está transcripcionalmente controlada por PhoP/PhoQ. Alberga 10 ORFs organizados en seis unidades transcripcionales, incluye al operón *mgtCB* que codifica la proteína MgtC (*intramacrophage survival protein*) y el transportador de Mg^{+2} de alta afinidad MgtB [19, 20].

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 [57, 94].

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 [95]. 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 [96]. *sopB*, *pipC*, *pipB* y *pipA*, están dentro de la misma unidad transcripcional cuya expresión está regulada por SsrA/B [90, 97].

Plásmidos y bacteriófagos

- El plásmido pSLT

El plasmido pSLT está 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 [20, 98, 99]. 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 [100, 101].

- Bacteriófagos

Todos los bacteriófagos conocidos del género *Salmonella* pertenecen al orden *Caudovirales*. Análisis proteómicos permitieron clasificarlos en cinco grupos: tipo P27 (ST64B), tipo P2 (Fels-2, SopE Φ y PSP3), tipo P22 (ϵ 34, ES18, P22, ST104 y ST64T), tipo T7 (SP6), los lambdoides (Gifsy-1, Gifsy-2 y Fels-1) y tres fagos independientes (ϵ 15, KS7 y Felix O-1) [102].

Procesos celulares de *Salmonella* importantes en su patogenicidad

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 [103]. *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 [34]. 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 [104].

Una vez finalizado el proceso de invasión, *Salmonella* presente en las vacuolas SCV utiliza un segundo T3SS codificado por la SPI-2 para liberar proteínas efectoras adicionales a través de la membrana de las vacuolas al citoplasma, permitiendo la supervivencia y replicación de la bacteria dentro de la célula hospedadora [106]. *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 [107]. 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 [108, 109].

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*) [110]. Los flagelos, se cree, facilitan la patogenicidad al permitir que *Salmonella* nade a los sitios de la invasión [111]. Además de la motilidad, el flagelo activa la expresión de citoquinas proinflamatorias [112] [113].

Análisis bioinformáticos demostraron que el T3SS de la SPI-1 comparte características con el sistema flagelar [114]. 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 [115].

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* [74, 117]. 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 [74, 118-121]. Sin embargo, se ha detectado inducción de la expresión de genes flagelares tras la invasión de las células epiteliales, entre cuatro y seis horas después de la entrada en la célula hospedadora [118, 121].

Por su parte, las fimbrias de tipo 1 son apéndices en forma de filamento que llevan adhesinas específicas que interactúan sobre la superficie de las células eucariotas [122]. Las fimbrias de tipo 1 están involucradas en patogenicidad ya que facilitan la unión de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino [123]. Múltiples estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre el T3SS de la SPI-1, el flagelo y las fimbrias de tipo [62, 77, 124, 125]. El regulador principal de los genes flagelares es el complejo FlhD₄C₂ que activa dos reguladores adicionales, FliA y FliZ, que están codificados dentro del operón *fliAZ* [110]. FliA es un factor sigma alternativo específico del flagelo, esencial para la expresión de los genes del motor, el filamento y la chemotaxis. FliZ es un activador post-transcripcional de FlhD₄C₂ [126]. FliZ también activa HilD y reprime FimZ post-transcripcionalmente [67, 72, 124, 127, 128, 129]. 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, se une al promotor *flhDC* y reprime la motilidad [62].

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 [125, 130, 131]. 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. [132], 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. [132] 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 (dos horas después de la invasión), mientras que la expresión simultánea de SPI1 y genes flagelares se reprimen de cuatro a seis horas después de la invasión [118].

Referencias

- [1] E. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover, *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., Mycopathologia, vol. 146, no. 2, pp. 107–108.
- [2] B. Coburn, G. A. Grassl, and B. B. Finlay, *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.*, vol. 85, no. 2, pp. 112–8, Jan. 2007.
- [3] E. Linder, *Toxicología de los alimentos*, Editor. Acribia. Zaragoza España, pp. 53–65, 1995.
- [4] B. J. Tindall, P. A. D. Grimont, G. M. Garrity, and J. P. Euzéby, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* vol. 55, no. Pt 1, pp. 521–4, Jan. 2005.
- [5] Grimont Pad and Weill FX, Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision. World Heal. Organ. Collab. Cent. Ref. Res. *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, Fr., 2007.
- [6] C. M. Parry, T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar, Typhoid fever., *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 22, pp. 1770–82, Nov. 2002.
- [7] M. E. Ohl and S. I. Miller, *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis, *Annu. Rev. Med.*, vol. 52, pp. 259–74, Jan. 2001.
- [8] M. Gordon, *Salmonella* infections in immunocompromised adults., *J. Infect.*, vol. 56, no. 6, pp. 413–422, 2008.
- [9] C. Wagner and M. Hensel, Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*., *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 715, pp. 17–34, Jan. 2011.
- [10] A. Guo, M. A. Lasaro, J.-C. Sirard, J.-P. Kraehenbühl, and D. M. Schifferli, “Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology*, vol. 153, no. Pt 4, pp. 1059–69, May 2007.
- [11] M. Lara-Tejero and J. E. Galán, *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 7, pp. 2635–42, Jul. 2009.
- [12] A. J. Müller et al., *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe*, vol. 11, no. 1, pp. 19–32, Jan. 2012.
- [13] T. S. Wallis and E. E. Galyov, Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.*, vol. 36, no. 5, pp. 997–1005, Jun. 2000.
- [14] M. McClelland et al., Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2., *Nature*, vol. 413, no. 6858, pp. 852–6, Oct. 2001.

- [15] C. Kröger et al., The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 109, no. 20, pp. E1277-86, May 2012.
- [16] C. K. Sherburne et al., The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer., Nucleic Acids Res., vol. 28, no. 10, pp. 2177–86, May 2000.
- [17] S. Stender, A. Friebel, S. Linder, M. Rohde, S. Miold, and W. D. Hardt, Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell., Mol. Microbiol., vol. 36, no. 6, pp. 1206–21, Jun. 2000.
- [18] H. Schmidt and M. Hensel, Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev., vol. 17, no. 1, pp. 14–56, Jan. 2004.
- [19] A. B. Blanc-Potard, F. Solomon, J. Kayser, and E. A. Groisman, The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. vol. 181, no. 3, pp. 998–1004, Feb. 1999.
- [20] S. L. Marcus, J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay, *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect., vol. 2, no. 2, pp. 145–56, Feb. 2000.
- [21] M. McClelland et al., Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid., Nat. Genet., vol. 36, no. 12, pp. 1268–74, Dec. 2004.
- [22] C. M. Collazo and J. E. Galán, The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review., Gene, vol. 192, no. 1, pp. 51–9, Jun. 1997.
- [23] C. P. Lostroh and C. A. Lee, The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system., Microbes Infect., vol. 3, no. 14–15, pp. 1281–91, Jan. 2001.
- [24] J. R. Ellermeier and J. M. Slauch, Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Curr. Opin. Microbiol., vol. 10, no. 1, pp. 24–9, Feb. 2007.
- [25] A. Fàbrega and J. Vila, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation, Clin. Microbiol. Rev., vol. 26, no. 2, pp. 308–341, 2013.
- [26] J. E. Galán, Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 209, pp. 43–60, Jan. 1996.
- [27] R. D. Hayward and V. Koronakis, Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*., EMBO J., vol. 18, no. 18, pp. 4926–34, Sep. 1999.

- [28] E. J. McGhie, R. D. Hayward, and V. Koronakis, Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein., *Mol. Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 497–510, Feb. 2004.
- [29] D. M. Wall, W. J. Nadeau, M. A. Pazos, H. N. Shi, E. E. Galyov, and B. A. McCormick, Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium., *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 9, pp. 2299–313, Sep. 2007.
- [30] S. K. Myeni and D. Zhou, The C Terminus of SipC Binds and Bundles F-actin to Promote *Salmonella* Invasion, *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 18, pp. 13357–13363, Mar. 2010.
- [31] M. C. Schlumberger et al., Two newly identified SipA domains (F1, F2) steer effector protein localization and contribute to *Salmonella* host cell manipulation., *Mol. Microbiol.*, vol. 65, no. 3, pp. 741–60, Aug. 2007.
- [32] M. Lilic, V. E. Galkin, A. Orlova, M. S. VanLoock, E. H. Egelman, and C. E. Stebbins, *Salmonella* SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms., *Science*, vol. 301, no. 5641, pp. 1918–21, Sep. 2003.
- [33] E. J. McGhie, R. D. Hayward, and V. Koronakis, Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin., *EMBO J.*, vol. 20, no. 9, pp. 2131–9, May 2001.
- [34] E. J. McGhie, L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis, *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host., *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 117–24, Feb. 2009.
- [35] D. Zhou, M. S. Mooseker, and J. E. Galán, Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization., *Science*, vol. 283, no. 5410, pp. 2092–5, Mar. 1999.
- [36] W. D. Hardt, L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, and J. E. Galán, *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells, *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 815–26, May 1998.
- [37] C. S. Bakshi, V. P. Singh, M. W. Wood, P. W. Jones, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells., *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 8, pp. 2341–4, Apr. 2000.
- [38] R. M. Jones, H. Wu, C. Wentworth, L. Luo, L. Collier-Hyams, and A. S. Neish, *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade, *Cell Host Microbe*, vol. 3, no. 4, pp. 233–44, Apr. 2008.

- [39] H. Wu, R. M. Jones, and A. S. Neish, The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo, *Cell. Microbiol.* vol. 14, no. 1, pp. 28–39, Jan. 2012.
- [40] R. L. Santos, R. M. Tsolis, A. J. Bäuml, R. Smith, and L. G. Adams, *Salmonella enterica* serovar typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early sipB-dependent and delayed sipB-independent mechanisms., *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 4, pp. 2293–301, Apr. 2001.
- [41] H. Gong, G.-P. Vu, Y. Bai, E. Yang, F. Liu, and S. Lu, Differential expression of *Salmonella* type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice., *Microbiology*, vol. 156, no. Pt 1, pp. 116–27, Jan. 2010.
- [42] Y. Fu and J. E. Galán, A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion., *Nature*, vol. 401, no. 6750, pp. 293–7, Sep. 1999.
- [43] K. Kaniga, J. Uralil, J. B. Bliska, and J. E. Galán, A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*., *Mol. Microbiol.*, vol. 21, no. 3, pp. 633–41, Aug. 1996.
- [44] C. E. Stebbins and J. E. Galán, Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1., *Mol. Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1449–60, Dec. 2000.
- [45] M. W. Wood et al., The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis., *Cell. Microbiol.*, vol. 2, no. 4, pp. 293–303, Aug. 2000.
- [46] F. A. Norris, M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov, and P. W. Majerus, SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 24, pp. 14057–9, Nov. 1998.
- [47] J. C. Patel and J. E. Galan, Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions, *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 3, pp. 453–463, Oct. 2006.
- [48] G. J. Hernandez, L. D. Hueffer K, Wenk MR, *Salmonella* Modulates Vesicular Traffic by Altering Phosphoinositide Metabolism, *Science* (80-.), vol. 304, no. 5678, pp. 1805–1807, Jun. 2004.
- [49] M. A. Jones, M. W. Wood, P. B. Mullan, P. R. Watson, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis, *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 12, pp. 5799–804, Dec. 1998.
- [50] E. C. Boyle, N. F. Brown, and B. B. Finlay, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt

- tight junction structure and function., *Cell. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1946–57, Dec. 2006.
- [51] R. M. Tsolis et al., Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis., *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 12, pp. 6385–93, Dec. 1999.
- [52] E. A. Miao et al., *Salmonella* Typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems., *Mol. Microbiol.*, vol. 34, no. 4, pp. 850–64, Nov. 1999.
- [53] C. A. Lee, B. D. Jones, and S. Falkow, Identification of a *Salmonella* Typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 5, pp. 1847–51, Mar. 1992.
- [54] K. H. Darwin and V. L. Miller, The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes., *Mol. Microbiol.*, vol. 35, no. 4, pp. 949–60, Feb. 2000.
- [55] K. H. Darwin and V. L. Miller, Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella* Typhimurium., *EMBO J.*, vol. 20, no. 8, pp. 1850–62, Apr. 2001.
- [56] C. D. Ellermeier, J. R. Ellermeier, and J. M. Slauch, HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 691–705, Aug. 2005.
- [57] R. G. Gerlach, D. Jäckel, N. Geymeier, and M. Hensel, *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*., *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 10, pp. 4697–709, Oct. 2007.
- [58] K. L. Main-Hester, K. M. Colpitts, G. A. Thomas, F. C. Fang, and S. J. Libby, Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 76, no. 3, pp. 1024–35, Mar. 2008.
- [59] I. M. V Thijs et al., Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis, *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 13, pp. 4587–4596, Jul. 2007.
- [60] L. A. Knodler, J. Celli, W.-D. Hardt, B. A. Vallance, C. Yip, and B. B. Finlay, *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems., *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 5, pp. 1089–103, Mar. 2002.
- [61] L. M. Schechter and C. A. Lee, AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium hilA promoter., *Mol. Microbiol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1289–99, Jun. 2001.

- [62] C. D. Ellermeier and J. M. Slauch, RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 17, pp. 5096–108, Sep. 2003.
- [63] S. Akbar, L. M. Schechter, C. P. Lostroh, and C. A. Lee, AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 3, pp. 715–28, Feb. 2003.
- [64] C. Altier, Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion., *J. Microbiol.*, vol. 43 Spec No, pp. 85–92, Feb. 2005.
- [65] K. Eichelberg, W. D. Hardt, and J. E. Galán, Characterization of SprA, an AraC-like transcriptional regulator encoded within the *Salmonella* Typhimurium pathogenicity island 1., *Mol. Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 139–52, Jul. 1999.
- [66] J. L. Rakeman, H. R. Bonifield, and S. I. Miller, A HilA-independent pathway to *Salmonella* Typhimurium invasion gene transcription., *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 10, pp. 3096–104, May 1999.
- [67] R. L. Lucas and C. A. Lee, Roles of hilC and hilD in regulation of hilA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 9, pp. 2733–45, May 2001.
- [68] L. M. Schechter, S. M. Damrauer, and C. A. Lee, Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the hilA promoter., *Mol. Microbiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 629–42, May 1999.
- [69] J. D. Boddicker, B. M. Knosp, and B. D. Jones, Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, hilA, requires HilD activation in the absence of negative regulators., *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 2, pp. 525–33, Jan. 2003.
- [70] B. L. Petrone, A. M. Stringer, and J. T. Wade, Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 5, pp. 1094–101, Mar. 2014.
- [71] T. Miki, N. Okada, and H. Danbara, Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system., *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34631–42, Aug. 2004.
- [72] D. Lin, C. V Rao, and J. M. Slauch, The *Salmonella* SPII type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 1, pp. 87–97, Jan. 2008.
- [73] M. A. Baxter, T. F. Fahlen, R. L. Wilson, and B. D. Jones, HilE interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression

- of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype., *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 3, pp. 1295–305, Mar. 2003.
- [74] T. Wada, T. Morizane, T. Abo, A. Tominaga, K. Inoue-Tanaka, and K. Kutsukake, EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 193, no. 7, pp. 1600–11, May 2011.
- [75] J. E. C. Chubiz, Y. A. Golubeva, D. Lin, L. D. Miller, and J. M. Slauch, FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 23, pp. 6261–70, Dec. 2010.
- [76] S. D. Lawhon, J. G. Frye, M. Suyemoto, S. Porwollik, M. McClelland, and C. Altier, Global regulation by CsrA in *Salmonella* Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1633–45, Jun. 2003.
- [77] M. A. Baxter and B. D. Jones, Two-component regulators control hilA expression by controlling fimZ and hilE expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 83, no. 3, pp. 978–85, Mar. 2015.
- [78] E. García Vescovi, F. C. Soncini, and E. A. Groisman, Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence., *Cell*, vol. 84, no. 1, pp. 165–74, Jan. 1996.
- [79] E. A. Groisman, The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal., *Bioessays*, vol. 20, no. 1, pp. 96–101, Jan. 1998.
- [80] V. Bajaj, R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee, Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression., *Mol. Microbiol.*, vol. 22, no. 4, pp. 703–14, Nov. 1996.
- [81] Y. A. Golubeva, A. Y. Sadik, J. R. Ellermeier, and J. M. Slauch, Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system., *Genetics*, vol. 190, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2012.
- [82] J. Deiwick, T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel, Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression., *Mol. Microbiol.*, vol. 31, no. 6, pp. 1759–73, Mar. 1999.
- [83] J. Deiwick, T. Nikolaus, J. E. Shea, C. Gleeson, D. W. Holden, and M. Hensel, Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents., *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 18, pp. 4775–80, Sep. 1998.
- [84] M. Hensel et al., Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of

- Salmonella* Pathogenicity Island 2., Mol. Microbiol., vol. 24, no. 1, pp. 155–67, Apr. 1997.
- [85] M. Hensel et al., Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages., Mol. Microbiol., vol. 30, no. 1, pp. 163–74, Oct. 1998.
- [86] J. R. Klein and B. D. Jones, *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system., Infect. Immun., vol. 69, no. 2, pp. 737–43, Feb. 2001.
- [87] E. Fass and E. A. Groisman, Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression., Curr. Opin. Microbiol., vol. 12, no. 2, pp. 199–204, Apr. 2009.
- [88] D. Walthers, R. K. Carroll, W. W. Navarre, S. J. Libby, F. C. Fang, and L. J. Kenney, The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS., Mol. Microbiol., vol. 65, no. 2, pp. 477–93, Jul. 2007.
- [89] M. J. Worley, K. H. Ching, and F. Heffron, *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes., Mol. Microbiol., vol. 36, no. 3, pp. 749–61, May 2000.
- [90] C. R. Beuzón, K. E. Unsworth, and D. W. Holden, In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system contribute independently to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence., Infect. Immun., vol. 69, no. 12, pp. 7254–61, Dec. 2001.
- [91] A. K. Lee, C. S. Detweiler, and S. Falkow, OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2, J. Bacteriol., vol. 182, no. 3, pp. 771–81, Feb. 2000.
- [92] V. H. Bustamante, L. C. Martínez, F. J. Santana, L. A. Knodler, O. Steele-Mortimer, and J. L. Puente, HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 105, no. 38, pp. 14591–6, Sep. 2008.
- [93] L. C. Martínez, M. M. Banda, M. Fernández-Mora, F. J. Santana, and V. H. Bustamante, HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from ssrAB., J. Bacteriol., vol. 196, no. 21, pp. 3746–55, Nov. 2014.
- [94] E. Morgan et al., Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Mol. Microbiol., vol. 54, no. 4, pp. 994–1010, Nov. 2004.

- [95] R. DeVinney, O. Steele-Mortimer, and B. B. Finlay, Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens., *Trends Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 29–33, Jan. 2000.
- [96] M. W. Wood, M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity., *Mol. Microbiol.*, vol. 29, no. 3, pp. 883–91, Aug. 1998.
- [97] P. A. Cotter and V. J. DiRita, Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective., *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, pp. 519–65, Jan. 2000.
- [98] H. Matsui, C. M. Bacot, W. A. Garlington, T. J. Doyle, S. Roberts, and P. A. Gulig, 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., *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 15, pp. 4652–8, Aug. 2001.
- [99] R. Rotger and J. Casadesús, The virulence plasmids of *Salmonella*, *Int. Microbiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 177–84, Sep. 1999.
- [100] A. L. Caldwell and P. A. Gulig, The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene., *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 22, pp. 7176–85, Nov. 1991.
- [101] M. Tezcan-Merdol D, Engstrand L, and Rhen, SpvB-mediated ADP-ribosylation as an activator for host cell actin degradation, *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 295, no. 4, pp. 201–212, Aug. 2005.
- [102] A. M. Kropinski, A. Sulakvelidze, P. Konczyk, and C. Poppe, *Salmonella* phages and prophages--genomics and practical aspects., *Methods Mol. Biol.*, vol. 394, pp. 133–75, Jan. 2007.
- [103] P. Velge et al., Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis., *Microbiologyopen*, vol. 1, no. 3, pp. 243–58, Oct. 2012.
- [104] R. L. Santos et al., Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style., *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 498–506, Dec. 2009.
- [105] S. Gruenheid and B. B. Finlay, Microbial pathogenesis and cytoskeletal function, *Nature*, vol. 422, no. 6933, pp. 775–781, 2003.
- [106] P. Malik-Kale, C. E. Jolly, S. Lathrop, S. Winfree, C. Luterbach, and O. Steele-Mortimer, *Salmonella* - at home in the host cell., *Front. Microbiol.*, vol. 2, p. 125, Jan. 2011.
- [107] I. M. Figueroa Ochoa and A. Verdugo Rodríguez, Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 1–2, pp. 25–42, 2005.
- [108] B. B. Finlay and S. Falkow, Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 61, no. 2, pp. 136–69, Jun. 1997.

- [109] J. C. Sirard, F. Niedergang, and J. P. Kraehenbuhl, Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines, *Immunol. Rev.*, vol. 171, pp. 5–26, Oct. 1999.
- [110] G. S. Chilcott and K. T. Hughes, Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 4, pp. 694–708, Dec. 2000.
- [111] C. K. Schmitt et al., Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis., *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 9, pp. 5619–25, Sep. 2001.
- [112] E. A. Miao et al., Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf., *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 569–75, Jun. 2006.
- [113] L. Franchi et al., Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages., *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 576–82, Jun. 2006.
- [114] F. Van Gijsegem et al., 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., *Mol. Microbiol.*, vol. 15, no. 6, pp. 1095–114, Mar. 1995.
- [115] H. M. Singer, M. Erhardt, and K. T. Hughes, Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates., *Mol. Microbiol.*, vol. 93, no. 3, pp. 505–20, Aug. 2014.
- [116] F. F. V Chevance and K. T. Hughes, Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine., *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 455–465, 2008.
- [117] K. Zhao, M. Liu, and R. R. Burgess, Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to ‘foraging’-like behavior in *E. coli*., *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 13, pp. 4441–52, Jan. 2007.
- [118] I. Hautefort et al., During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems., *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 958–84, May 2008.
- [119] C. Beloin and J.-M. Ghigo, Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms, *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 16–9, Jan. 2005.

- [120] S. Eriksson, S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. D. Hinton, Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*., *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 103–18, Jan. 2003.
- [121] B. Cummings, *Microbiology: An Introduction*, 9th editio. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings, 2006.
- [122] S. W. Ewen et al., *Salmonella enterica* var Typhimurium and *Salmonella enterica* var Enteritidis express type 1 fimbriae in the rat in vivo., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 18, no. 3, pp. 185–92, Jul. 1997.
- [123] A. J. Bäuml, R. M. Tsohis, and F. Heffron, Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 5, pp. 1862–5, May 1996.
- [124] S. Iyoda, T. Kamidoi, K. Hirose, K. Kutsukake, and H. Watanabe, A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Microb. Pathog.*, vol. 30, no. 2, pp. 81–90, Mar. 2001.
- [125] S. Clegg and K. T. Hughes, FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 4, pp. 1209–13, Mar. 2002.
- [126] S. Saini, J. D. Brown, P. D. Aldridge, and C. V Rao, FliZ Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagellar gene expression., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 14, pp. 4979–88, Jul. 2008.
- [127] H. Kage, A. Takaya, M. Ohya, and T. Yamamoto, Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 7, pp. 2470–8, May 2008.
- [128] F. Van Immerseel, V. Eeckhaut, F. Boyen, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle, Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hilA*., *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 94, no. 3, pp. 455–61, Oct. 2008.
- [129] S. Saini, J. M. Slauch, P. D. Aldridge, and C. V Rao, Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes., *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 21, pp. 5767–77, Nov. 2010.
- [130] M. A. Baxter and B. D. Jones, The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility., *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 3, pp. 1377–85, Mar. 2005.
- [131] S. Saini, J. A. Pearl, and C. V Rao, Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type i fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 9, pp. 3003–10, May 2009.

- [132] H. M. Singer, C. Kühne, J. A. Deditius, K. T. Hughes, and M. Erhardt, The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon flhDC., *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 7, pp. 1448–57, May 2014.