

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Regulación de la expresión y función de la polimerasa del  
antígeno O de *Shigella flexneri* 2a: rol del antiterminador RfaH  
y de los reguladores del largo de cadena Wzz**

Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al Grado de

Doctor en Bioquímica

por

**JAVIER ANTONIO CARTER JAÑA**

Directores de Tesis:

Dra. Lucía Inés Contreras O.

Dr. Sergio Álvarez A.

2008

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1040562 y ANILLO ACT 08/06 de la Dra. Inés Contreras O. y las becas: Programa de Doctorado en Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas (2004), Beca CONICYT para estudios de postgrado (2005-2007), Becas de estancias cortas de investigación de la Universidad de Chile (2007) y Beca CONICYT de término de tesis (2008) obtenidas por Javier Carter Jaña.

*Este trabajo está dedicado  
a mis queridos padres y abuelos*

Los resultados y conocimientos generados de la presente Tesis dieron origen total o parcialmente a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos.

**Publicaciones:**

**Carter JA**, Blondel CJ, Zaldívar M, Alvarez SA, Marolda CL, Valvano MA, Contreras I. (2007). O-antigen modal chain length in *Shigella flexneri* 2a is growth-regulated through RfaH-mediated transcriptional control of the *wzy* gene. *Microbiology*. 2007 153, (10): 3499-507

**Presentaciones a congresos nacionales:**

Contreras I., Martinic M., Zaldívar M., Bravo D., Hoare A., Álvarez S. y **Carter J.A.** El lipopolisacárido de *Shigella flexneri* 2a: Una molécula sorprendente. XXIX Congreso Chileno de Microbiología. Viña del Mar, Chile. 2007.

**Carter J.A.**, Blondel C.J., Silva C., Altamirano F., Álvarez S.A. y Contreras I. El nivel de expresión de *wzy* determina la síntesis de VL-AgO en *Shigella flexneri* 2a. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Púcon, Chile. 2006.

**Carter J.**, Blondel C., Altamirano F., Nieto P., Salas R., Alvarez S. y Contreras I. Regulación fase dependiente de la producción de Antígeno O en *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Shigella flexneri*. XXVII Congreso Chileno de Microbiología. Pucón, Chile. 2005.

**Presentaciones a congresos internacionales:**

Hoare A., **Carter J.A.**, Valvano M.A. and Contreras I. *Shigella flexneri* interaction with epithelial cells: participation of the lipopolysaccharide in invasion and effect of the bacterial-cell contact on O-antigen length. 108<sup>TH</sup> ASM General Meeting, Boston, MA, USA. 2008.

**Carter J.A.**, Blondel C.J., Zaldívar M., Álvarez S.A., Marolda C.L., Valvano M.A. and Contreras I. Differential Growth Phase-Dependent Regulation of O-Antigen Synthesis in *Shigella flexneri* 2a: Role of the RfaH elongation Factor. (II). 107<sup>TH</sup> ASM General Meeting, Toronto, Ontario, Canada. 2007.

# Índice general

	Página
<b>Índice general.</b> .....	i
<b>Índice de Tablas.</b> .....	iv
<b>Índice de Figuras.</b> .....	v
<b>Abreviaturas.</b> .....	vi
<b>Resumen.</b> .....	viii
<b>Summary.</b> .....	x
<b>1. Introducción.</b> .....	1
1.1. Patogenia de la infección por <i>S. flexneri</i> . .....	1
1.2. Lipopolisacárido de <i>Shigella</i> : Estructura y Biosíntesis. ....	3
1.3. Control de la polimerización por Wzz. ....	6
1.4. Modulación ambiental del AgO. Mecanismos y papel en la virulencia bacteriana. ....	7
1.5. Regulación del AgO mediada por RfaH. ....	8
<b>2. Materiales y Métodos.</b> .....	12
2.1. Reactivos. ....	12
2.2. Cepas bacterianas. ....	14
2.3. Plasmidios. ....	15
2.4. Partidores. ....	17
2.5. Medios y condiciones de cultivo. ....	19
2.6. Técnicas bioquímicas. ....	19
2.6.1. Análisis del lipopolisacárido en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina. ....	19
2.6.1.1. Obtención de las muestras. ....	19
2.6.1.2. Electroforesis. ....	20
2.6.1.3. Detección del LPS mediante tinción con plata. ....	21
2.6.1.4. Detección del LPS mediante Western blot. ....	22
2.6.1.5. Análisis densitométrico. ....	22
2.6.1.6. Análisis estadístico. ....	23
2.6.2. Medición de la actividad $\beta$ -galactosidasa. ....	23
2.6.3. Obtención de proteínas. ....	23
2.6.4. Determinación de la concentración de proteínas. ....	24
2.6.5. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas. ....	24

	Página
2.6.6. Ensayos de Western Blot. ....	25
2.6.6.1. Transferencia y bloqueo. ....	25
2.6.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia. ....	26
2.6.6.3. Inmunodetección por fluorescencia. ....	26
2.7. Estudio de interacción de proteínas. ....	26
2.7.1. Ensayos de entrecruzamiento. ....	26
2.7.1.1. Entrecruzamiento <i>in vivo</i> . ....	27
2.7.1.2. Entrecruzamiento <i>in vitro</i> . ....	28
2.7.2. Ensayos de inmunoprecipitación. ....	28
2.8. Técnicas básicas de biología molecular. ....	29
2.8.1. Purificación de ácidos nucleicos. ....	29
2.8.1.1. Extracción de DNA cromosomal. ....	29
2.8.1.2. Extracción de DNA plasmidial. ....	29
2.8.1.3. Purificación de DNA desde un gel de agarosa. ....	30
2.8.1.4. Extracción de RNA total. ....	30
2.8.2. Electroforesis de ácidos nucleicos. ....	31
2.8.2.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa. ....	31
2.8.2.2. Electroforesis de RNA en geles denaturantes. ....	31
2.8.2.3. Análisis densitométrico de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. ....	32
2.8.3. Digestión con enzimas de restricción. ....	32
2.9. Transformación de plasmidios o productos de PCR. ....	32
2.10. Obtención de mutantes en <i>S. flexneri</i> 2457T. ....	33
2.10.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis. ....	33
2.10.2. Mutagénesis. ....	33
2.10.3. Eliminación del casete de resistencia. ....	35
2.10.4. Construcción de doble mutantes. ....	35
2.10.5. Construcción de fusiones FLAG3x. ....	35
2.11. Construcción de plasmidios de expresión. ....	36
2.11.1. Construcción de plasmidios utilizando el sistema pGEM T-Easy. ....	36
2.11.2. Clonamiento en el vector pBAD24. ....	37
2.11.3. Clonamiento en el vector pSCRhaB2. ....	37
2.11.4. Secuenciación de plasmidios. ....	38
2.11.5. Ensayos de inducción o represión. ....	38
2.12. Determinación de la actividad de los promotores de los genes <i>rfaH</i> , <i>wzzB</i> y <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> . ·	38
2.12.1. Clonamiento de las regiones promotoras de los genes <i>rfaH</i> , <i>wzzB</i> y <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> . ....	38
2.12.2. Construcción de fusiones transcripcionales. ....	39

	Página
2.12.3. Secuenciación de las regiones promotoras. ....	40
2.13. Determinación del nivel celular del transcrito del gen <i>wzy</i> mediante RT-PCR en Tiempo Real (qPCR). ....	40
2.13.1. Digestión con DNasa I. ....	40
2.13.2. Transcripción inversa. ....	41
2.13.3. Optimización de los ensayos de RT-PCR en Tiempo Real. ....	41
2.13.4. Ensayos de RT-PCR en Tiempo Real. ....	42
2.13.5. Análisis de los datos de RT-PCR en Tiempo Real mediante el método de la Curva Estándar Relativa. ....	43
2.14. Análisis estadístico. ....	44
<b>3. Resultados.</b> .....	45
3.1. La producción de VL-AgO aumenta a lo largo del crecimiento de <i>S. flexneri</i> 2a. ....	45
3.2. La producción de VL-AgO se correlaciona con la expresión de <i>rfaH</i> . ....	47
3.3. RfaH es necesario para la producción y correcta distribución modal del antígeno O en <i>S. flexneri</i> . ....	48
3.4. Requerimiento de RfaH para la expresión del operón <i>wba</i> . ....	50
3.5. La cantidad de Wzy determina la distribución de los largos de cadena del antígeno O. ·	54
3.6. Presencia de codones infrecuentes en el gen <i>wzy</i> . ....	59
3.7. El control de la expresión de los reguladores del largo de cadena es independiente de RfaH. ....	64
3.8. La cantidad relativa de la polimerasa y los reguladores del largo de cadena es importante para determinar un LPS silvestre. ....	66
3.9. Las proteínas Wzy y WzzB oligomerizan independientemente. ....	71
<b>4. Discusión.</b> .....	77
<b>5. Conclusiones.</b> .....	88
<b>6. Bibliografía.</b> .....	89

## Índice de Tablas

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis. ....	14
<b>Tabla 2.</b> Plasmidios utilizados en la presente Tesis. ....	15
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados en la presente Tesis. ....	17
<b>Tabla 4.</b> Gel resolutivo para análisis de LPS. ....	20
<b>Tabla 5.</b> Gel concentrador para análisis de LPS. ....	21
<b>Tabla 6.</b> Gel resolutivo para análisis de proteína. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Gel concentrador para análisis de proteína. ....	25
<b>Tabla 8.</b> Agentes entrecruzantes. ....	27
<b>Tabla 9.</b> Codones infrecuentes del transcrito de <i>wzy</i> de <i>S. flexneri</i> 2a 2457T. ....	60



## Índice de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de la estructura del LPS de <i>Shigella flexneri</i> 2a 2457T. ....	4
<b>Figura 2.</b> Modelo de la vía de ensamblaje del antígeno O <i>wzy</i> dependiente. ....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura genética del operón <i>wba</i> responsable de la síntesis del antígeno O en <i>S. flexneri</i> 2a 2457T. ....	9
<b>Figura 4.</b> Producción de LPS en <i>S. flexneri</i> 2a durante el crecimiento. ....	46
<b>Figura 5.</b> Expresión de <i>rfaH</i> durante el crecimiento bacteriano. ....	47
<b>Figura 6.</b> Expresión de la fusión RfaH-Flag3x en las distintas fases del crecimiento. ....	48
<b>Figura 7.</b> Efecto de la delección de <i>rfaH</i> sobre la producción de LPS durante el crecimiento en <i>S. flexneri</i> 2a. ....	49
<b>Figura 8.</b> Efecto del gen <i>rfaH</i> en la expresión de <i>wzy</i> en <i>S. flexneri</i> 2a. ....	51
<b>Figura 9.</b> Presencia de posibles terminadores intrínsecos de la transcripción en el operón <i>wba</i> . ....	53
<b>Figura 10.</b> Efecto de la sobreexpresión de la polimerasa en la mutante $\Delta rfaH$ (MSF487) y la cepa silvestre (2457T). ....	55
<b>Figura 11.</b> Efecto de la expresión controlada de <i>wzy</i> sobre la síntesis de AgO en una mutante $\Delta wzy$ (MSF114). ....	56
<b>Figura 12.</b> Análisis de la polimerasa Wzy mediante Western blot. ....	58
<b>Figura 13.</b> Índice de adaptabilidad relativa (CAI) de los codones presentes en el transcrito de <i>wzy</i> . ....	61
<b>Figura 14.</b> Ubicación de aminoácidos codificados por codones infrecuentes en Wzy. ....	63
<b>Figura 15.</b> Efecto de RfaH sobre la expresión de los reguladores del largo de cadena durante el crecimiento. ....	65
<b>Figura 16.</b> Análisis de la producción de WzzB y Wzz <sub>pHS2</sub> durante el crecimiento bacteriano. ....	66
<b>Figura 17.</b> Efecto de la sobreexpresión de los reguladores del largo de cadena o la polimerasa del AgO sobre el perfil de LPS en la cepa silvestre (2457T). ....	67
<b>Figura 18.</b> Efecto de la expresión controlada mediante plasmidios inducibles de los reguladores WzzB o Wzz <sub>pHS2</sub> sobre el perfil de LPS en una cepa mutante $\Delta wzzB$ (MSF102) o $\Delta wzz_{pHS2}::aph$ (MSF107). ....	69
<b>Figura 19.</b> Efecto de la expresión controlada de los reguladores del largo de cadena sobre el perfil de LPS en la cepa doble mutante $\Delta wzzB wzz_{pHS2}::aph$ (MSF209). ....	71
<b>Figura 20.</b> Detección simultánea de Wzy-Flag3x y WzzB mediante Western blot. ....	73
<b>Figura 21.</b> Entrecruzamiento <i>in vivo</i> utilizando DSP o DSG sobre las cepas WT (2457T) y <i>wzy</i> -Flag3x (MSF117). ....	75
<b>Figura 22.</b> Entrecruzamiento <i>in vitro</i> utilizando DSP, EGS, o formaldehído sobre proteínas de membranas obtenidas de las cepas WT (2457T), <i>wzy</i> -Flag3x $\Delta wzz_{pHS2}::aph$ (MSF224) y $\Delta wzzB \Delta wzz_{pHS2}::aph$ (MSF209). ....	76
<b>Figura 23.</b> Inmunoprecipitación de Wzy-Flag3x. ....	77
<b>Figura 24.</b> Modelo de la regulación de la síntesis de AgO en <i>S. flexneri</i> 2a. ....	87

## Abreviaturas

<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>Å:</b>	Angstrom
<b>Abs:</b>	Absorbancia
<b>AgO:</b>	Antígeno O
<b>AL:</b>	Agar Luria
<b>Amp:</b>	Ampicilina
<b>APS:</b>	Persulfato de amonio
<b>BSA:</b>	Seroalbúmina bovina
<b>Cam:</b>	Cloranfenicol
<b>CL:</b>	Caldo Luria
<b>csp:</b>	Cantidad suficiente para
<b>Ct:</b>	Ciclo umbral
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>DSG:</b>	di-succinimidil glutarato
<b>DSP:</b>	di-tiobis-[succinimidil propionato]
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGS:</b>	Etilenglicol-bis-[succinimidil-succinato]
<b>g:</b>	Gramos
<b>h:</b>	Hora
<b>Kan:</b>	Kanamicina
<b>kb:</b>	Kilobases
<b>L:</b>	Litros
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido
<b>mA:</b>	Mili Amper
<b>min:</b>	Minutos
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>Nal:</b>	Ácido nalidíxico
<b>ONPG:</b>	Orto-nitrofenilgalactopiranosido
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMSF:</b>	Fenilmetilsulfonil fluoruro

<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativo o PCR en tiempo real
<b>S-AgO:</b>	Antígeno O corto
<b>s:</b>	Segundos
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
<b>TAE:</b>	Amortiguador Tris-ácido acético-EDTA
<b>TEMED:</b>	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
<b>Tm:</b>	Trimetoprim
<b>µg:</b>	Micro gramos
<b>ufc:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UTR:</b>	Región no traducida
<b>V:</b>	Voltios
<b>VL-AgO:</b>	Antígeno O largo
<b>X-Gal:</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido

## Resumen

*Shigella* spp. son bacilos Gram negativo pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son patógenos exclusivos del ser humano causantes de shigelosis, una enfermedad severa que produce inflamación y destrucción del epitelio intestinal. Las infecciones por *Shigella* constituyen un problema de Salud Pública a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. De las especies de *Shigella*; *S. flexneri* y *S. sonnei* son responsables de la mayor mortalidad, siendo *S. flexneri* 2a el serotipo más importante en Chile.

Uno de los factores que contribuyen a la patogenicidad de *S. flexneri* es el lipopolisacárido, el cual confiere a la bacteria resistencia al complemento y participa directa e indirectamente en la destrucción de la mucosa intestinal. Sin embargo, el lipopolisacárido de *Shigella* ha sido poco estudiado en comparación con otras enterobacterias y no se conocen los mecanismos que regulan su expresión.

El lipopolisacárido es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativo. Es un glicolípido complejo constituido por tres dominios: el lípido A, el “core” de oligosacáridos y el antígeno O formado por subunidades repetidas de azúcares que se proyectan hacia el exterior de la bacteria. La polimerización del antígeno O la realiza la enzima polimerasa Wzy y el largo de la cadena de antígeno O es regulado por Wzz. En *S. flexneri* el antígeno O presenta una distribución bi-modal o dos largos preferenciales de cadena: un antígeno O de moda corta (S-AgO) regulada por la proteína WzzB y uno de moda larga (VL-AgO) regulada por la proteína Wzz<sub>pHS2</sub>, codificadas en el cromosoma y en el plasmidio pHS2, respectivamente.

Nuestra investigación se ha dirigido al estudio de los mecanismos que regulan la biosíntesis del lipopolisacárido. Demostramos que en *S. flexneri* 2a 2457T existe una regulación diferencial, fase dependiente, de la síntesis de antígeno O. En fase exponencial tardía y estacionaria aumenta la moda VL-AgO mientras que la moda S-AgO se mantiene constante durante el crecimiento. El aumento del antígeno O se correlaciona con el aumento de la transcripción del gen *rfaH* y de la cantidad de esta proteína. RfaH es un antiterminador transcripcional, que permite la transcripción de operones largos,

superando las pausas en la transcripción. Regula un gran número de componentes de membrana en enterobacterias, entre ellos el lipopolisacárido. El operón *wba* es el encargado de la síntesis de antígeno O en *S. flexneri* y presenta una secuencia *ops* en su región 5' UTR, reconocida por RfaH.

En una mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487) la polimerización de antígeno O se ve afectada severamente, observándose, en geles de poliacrilamida teñidos con plata, moléculas de antígeno O de bajo peso molecular, menor cantidad de S-AgO y ausencia de VL-AgO. El defecto en la polimerización en esta mutante es el resultado de una menor expresión del gen *wzy*, que codifica para la polimerasa del antígeno O, medida por ensayos de RT-PCR en tiempo real. El gen *wzy* es el último gen del operón *wba*, por lo tanto su expresión depende de la función de RfaH.

La complementación de la mutante MSF487 con el gen *wzy* restauró la síntesis de antígeno O de alto peso molecular. Esto sugiere que la cantidad de Wzy es importante no sólo para la polimerización, sino también para la distribución modal. Por otra parte, el aumento del dosaje génico de *wzzB* o *wzz<sub>pHS2</sub>* desplazó la polimerización hacia la moda que es controlada por el regulador sobreexpresado, lo que indica que el nivel de estos reguladores también es crucial para determinar la distribución modal.

De este modo, estos resultados indican que debe existir un balance entre los niveles de la polimerasa y los reguladores del largo de cadena y además, de acuerdo a las hipótesis propuestas para el mecanismo de acción de Wzz, apuntan a la posible formación de un complejo multiproteico encargado de la síntesis de antígeno O. Para probar esta hipótesis se realizaron ensayos de entrecruzamiento *in vivo* e *in vitro*. Estos ensayos mostraron que WzzB y Wzy son capaces individualmente de formar estructuras de mayor peso molecular, posiblemente correspondientes a un dímero o trímero. Sin embargo, no lograron resolver la interacción entre WzzB y Wzy.

Los resultados de esta Tesis indican la importancia de RfaH en la síntesis de antígeno O en *S. flexneri*, y su efecto sobre la transcripción de *wzy*. Además, señalan que la expresión de los genes *wzy*, *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>* está finamente regulada para determinar un apropiado balance entre las proteínas responsables de la polimerización y distribución modal, para producir un antígeno O normal.

## Summary

*Shigella spp.* are Gram negative rod-shaped bacteria that belong to the *Enterobacteriaceae* family. They are exclusive human pathogens and the causative agent of shigellosis, a severe disease that produces inflammation and destruction of the intestinal epithelia. *Shigella* infections are a serious Public Health problem worldwide, especially in developing countries. Among all *Shigella* species, *S. flexneri* and *S. sonnei* are responsible for most of the mortality, being *S. flexneri* 2a the most important serotype in Chile.

One factor that contributes to the pathogenicity of *S. flexneri* is the lipopolysaccharide, a molecule that confers complement resistance and directly participates in the destruction of the intestinal mucosa. However, the lipopolysaccharide of *Shigella* has been poorly studied in comparison to other enterobacteria and the mechanisms that regulate its expression are currently unknown.

Lipopolysaccharide is the main component of the outer membrane in Gram negative bacteria. It is a complex glycolipid constituted by three domains: the lipid A inner region, the core oligosaccharide, and the O-antigen formed by repeat sugar units that project to the exterior of the bacterium. The O-antigen polymerization is driven by the Wzy O-antigen polymerase and the O-antigen chain length is determined by the chain length regulator Wzz. In *S. flexneri* the O-antigen presents a bi-modal distribution or has two preferred chain lengths: a short modal distribution (S-OAg) regulated by WzzB and a very long modal distribution (VL-OAg) regulated by Wzz<sub>pHS2</sub>, encoded in the chromosome and in the pHS-2 plasmid, respectively.

Our research has focused on the study of mechanisms that regulate lipopolysaccharide biosynthesis. We showed that in *S. flexneri* 2a 2457T, there is a differential phase-dependent regulation of O-antigen synthesis. In late exponential and stationary phases the VL-OAg increases while the S-OAg remains constant during growth. The increase in O-antigen correlated with the increase in *rfaH* transcription and protein level. RfaH is a transcriptional antiterminator that allows the transcription of long operons overcoming transcriptional pauses. It regulates a great number of membrane components

in enterobacteria, including the operons involved in lipopolysaccharide synthesis. The *wba* operon encodes the enzymes for O-antigen synthesis in *S. flexneri* and has an *ops* sequence in its 5' UTR region, recognized by RfaH.

In a  $\Delta rfaH$  (MSF487) mutant, O-antigen polymerization was severely affected, showing, in polyacrylamide gels stained with silver, low molecular weight O-antigen, fewer amount of S-OAg and absence of VL-AgO. The defect in polymerization in this mutant was the result of a reduced expression of the *wzy* gene, which encodes the O-antigen polymerase, measured by real time RT-PCR experiments. The *wzy* gene is the last gene of the *wba* operon, so its expression is dependent of RfaH function.

Complementation of the MSF487 mutant with the *wzy* gene restored high molecular weight O-antigen synthesis. This suggests that the amount of Wzy is important not only for polymerization but for O-antigen modal distribution as well. On the other hand, the increase in the genetic dosage of either *wzzB* or *wzz<sub>pHS2</sub>* displaced the polymerization towards the modal chain length controlled by the overexpressed regulator, which indicates that the level of the regulators is crucial to determine the modal distribution.

In this way, these results indicate that a proper balance between the polymerase and chain length regulators is required, moreover, the theories proposed for the Wzz mechanism of action, point out to the formation of a possible multiprotein complex in charge of O-antigen synthesis. In order to test this hypothesis, *in vivo* and *in vitro* crosslinking assays were performed. The crosslinking assays showed that WzzB and Wzy were able to form, individually, higher molecular weight structures, possibly corresponding to a dimer or trimer. However, the interaction between WzzB and Wzy was not resolved.

The results of this Thesis underlie the importance of *rfaH* in O-antigen synthesis in *S. flexneri*, and its effect on *wzy* transcription. Furthermore, they imply that the expression of the genes *wzy*, *wzzB* and *wzz<sub>pHS2</sub>* is subject to fine regulation in order to determine a proper balance between the proteins responsible for the polymerization and modal distribution, so that a normal O-antigen is produced.

## 1. Introducción

*Shigella* spp. son bacilos Gram negativo pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son patógenos intracelulares facultativos, capaces de colonizar el epitelio intestinal en humanos, causando shigelosis. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación aguda de la mucosa intestinal, produciendo severo daño del tejido, ulceraciones y diarrea. Tiene una frecuencia mundial anual estimada en 164,7 millones de casos, de los cuales 1,1 millón tiene desenlace fatal y cerca del 99 % ocurre en países en vías de desarrollo. De los infectados, el 69 % corresponde a niños menores de cinco años (Jennison & Verma, 2004).

A nivel mundial, dentro de las especies de *Shigella*, *S. flexneri* es endémica en la mayoría de los países en desarrollo y causante de la mayor mortalidad. En Chile, *Shigella* es un importante patógeno que se asocia con el 22 % de los casos de disentería (diarrea sanguinolenta) y 5,4 % de diarrea acuosa. *S. flexneri* y *S. sonnei* dan cuenta de la enfermedad (Toro *et al.*, 2005).

### 1.1. Patogenia de la infección por *S. flexneri*.

*Shigella* es altamente contagiosa ya que se requieren sólo 10 a 100 bacterias para generar el cuadro infeccioso (DuPont *et al.*, 1989). La infección se produce por transmisión de persona a persona o por ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria. Una vez ingresada al organismo, *Shigella* sobrevive al ambiente ácido del estómago (Gorden & Small, 1993) y alcanza el intestino grueso, donde es capaz de atravesar la mucosa por transcitosis, utilizando las células M del tejido folicular asociado (Wassef *et al.*, 1989). Una vez en la submucosa, las bacterias ingresan a los macrófagos por un mecanismo de macropinocitosis gatillado por la bacteria. *Shigella* puede escapar de la vacuola fagocítica del macrófago y producir apoptosis mediante la activación de caspasa-1 (Hilbi *et al.*, 1998). Además, invade las células epiteliales por la región basolateral por un proceso de fagocitosis inducido por la bacteria. Dentro de las células epiteliales, se replica y disemina a las células epiteliales adyacentes destruyendo el tejido intestinal (Mantis *et al.*, 1996). La muerte de macrófagos, junto con la invasión de las células epiteliales genera un aumento de IL-1 e IL-8, respectivamente. Ambas citoquinas funcionan



como atrayentes para las células polimorfonucleares (PMN), las que migran hacia el lumen atravesando el epitelio. Esto desestabiliza la organización de las uniones estrechas permitiendo el ingreso de más bacterias desde el lumen hacia la submucosa (Perdomo *et al.*, 1994). Algunos autores postulan que, además, *Shigella* puede ingresar a la submucosa modificando directamente las uniones estrechas de las células del epitelio, en una forma independiente de PMN y células M (Sakaguchi *et al.*, 2002).

Los genes involucrados en la invasión de células epiteliales de *S. flexneri* se encuentran codificados en un plasmidio de virulencia de 220 kb. En éste se encuentran 32 genes organizados en dos *loci* que se transcriben en dirección opuesta y son necesarios y suficientes para la formación del foco de entrada. Estos son el locus *mxi-spa*, que codifica para el sistema especializado de secreción tipo III (SSTT) que forma el complejo aguja y permite la entrada de proteínas bacterianas dentro de la célula epitelial y el locus *ipaBCDA*, que codifica para las proteínas translocadas por este SSTT, que median la pinocitosis (Menard *et al.*, 1993). Ambos operones están regulados a nivel transcripcional por el producto del gen *virB* que a su vez es regulado por el gen *virF*, ambos incluidos en el plasmidio de virulencia. En el plasmidio, fuera de estos operones, se encuentra el gen *icsA* que codifica la proteína IcsA responsable de la movilización intra e intercelular de la bacteria (Dorman & Porter, 1998).

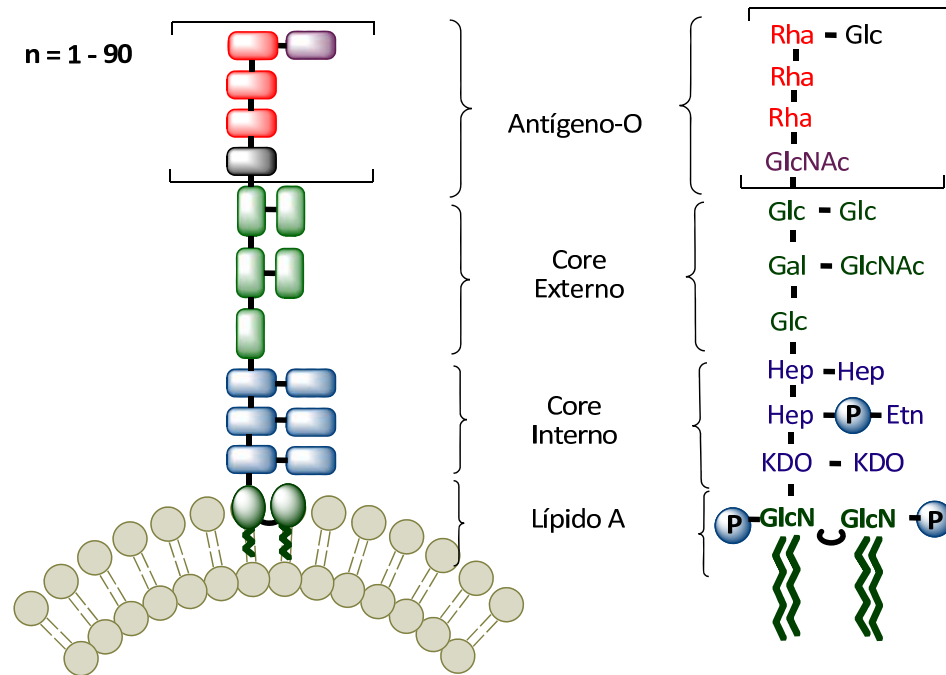
Además de estos genes presentes en el plasmidio, otros operones cromosomales son importantes para la virulencia. Entre ellos se encuentran los genes responsables de la síntesis del Lipopolisacárido (LPS). Okada *et al* (1991) analizaron el fenotipo invasivo de mutantes obtenidas por inserciones con Tn5 y encontraron que mutantes en los operones para la síntesis del “core” y del polisacárido O del LPS, eran capaces de invadir y de replicarse en células epiteliales pero perdían su capacidad de movilizarse intracelularmente y diseminarse a las células adyacentes. Estudios posteriores demostraron que la incapacidad de movilización se debía a una disfunción de la proteína IcsA por ausencia de un LPS normal (Sandlin *et al.*, 1995; Van den Bosch *et al.*, 1997; Van den Bosch & Morona, 2003). Por otra parte, se ha descrito que el polisacárido O de *S. flexneri* por si solo es capaz de causar inflamación y hemorragia contribuyendo así al cuadro de diarrea (Zhong, 1999).

## 1.2. Lipopolisacárido de *Shigella*: Estructura y Biosíntesis.

El LPS es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativo. Constituye el antígeno inmunodominante y determina muchas de las propiedades de su interacción con el hospedero (Rietschel *et al.*, 1994). El LPS es la endotoxina responsable de las manifestaciones tóxicas de las infecciones severas por bacterias Gram negativo, que desembocan en inflamación generalizada y shock tóxico (Raetz, 1990).

El LPS está constituido por 3 dominios covalentemente unidos: el **lípidio A** formado por azúcares fosforiladas y aciladas, que se encuentra inserto en la membrana externa; el **“core”**, constituido por hexosas y heptosas, que conecta al lípidio A con el componente más externo, el **polisacárido O** (Schnaitman & Klena, 1993). Este último, es un polímero de oligosacáridos formado generalmente por unidades de cuatro a seis azúcares, repetidas hasta 90 veces dependiendo de la especie. Este componente presenta una enorme variabilidad estructural y determina la especificidad serológica de la bacteria, por lo que se denomina antígeno O o somático. En *S. flexneri* 2a, este polímero está formado por unidades repetidas de un pentasacárido constituido por N-acetil glucosamina, ramnosa y glucosa (Fig. 1).

La biosíntesis y ensamblaje del LPS es un proceso complejo que involucra un gran número de genes localizados en distintas regiones del cromosoma. Estos genes incluyen el *locus waa (rfa)*, responsable de la síntesis del “core”, ubicado en el centisoma 81 y el *locus wba (rfb-wzy-wzz)*, que contiene los genes necesarios para la síntesis, ensamblaje y translocación del antígeno O, localizado en el centisoma 44 del genoma de *S. flexneri* (Okada *et al.*, 1991).

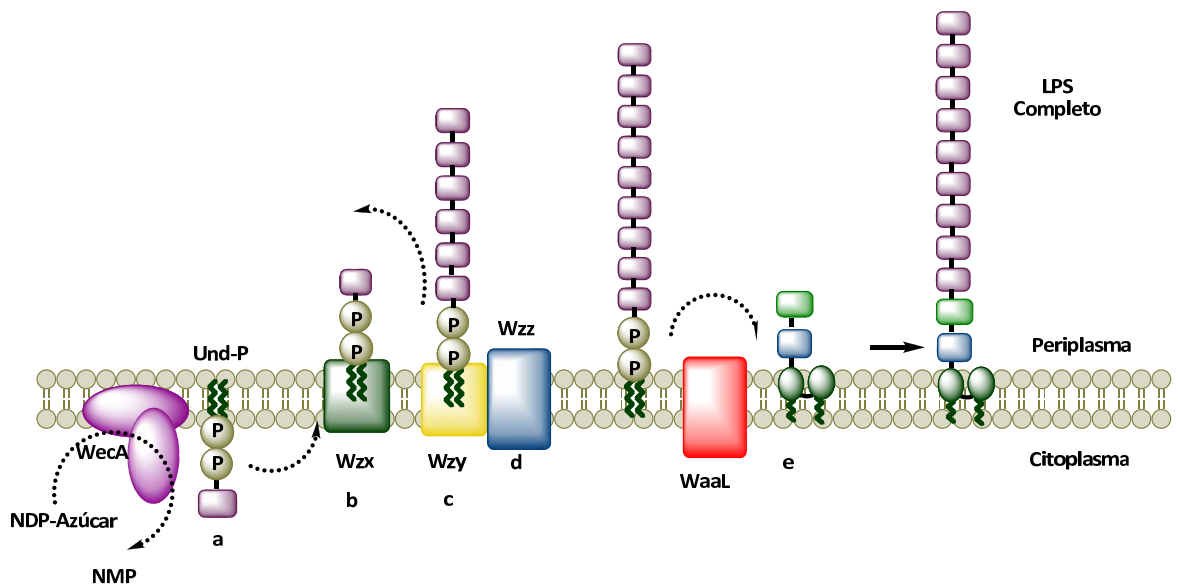


**Figura 1.** Diagrama esquemático de la estructura del LPS de *Shigella flexneri* 2a 2457T. Se muestra la subunidad de antígeno O, compuesta por N acetil glucosamina, ramnosa y glucosa. (descrito según Sandlin *et al.* (1996) y Schnaitman & Klena (1993)). Abreviaturas: GlcN: glucosamina, KDO: ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico, Hep: heptosa, P: fosfato, EtN: etanolamina, Gal: galactosa, Glu: glucosa, GlcNAc: N-acetil glucosamina, Rha: ramnosa.

La biosíntesis del LPS se realiza en dos etapas separadas. Por una parte se sintetiza el antígeno O, que posteriormente se liga a la estructura preformada de lípido A-“core”. En *S. flexneri* como en otras enterobacterias, el antígeno O se sintetiza por una vía denominada “wzy (polimerasa) dependiente”. Esta vía (Fig. 2) comienza con la adición de UDP-N-acetil glucosamina al transportador lipídico undecaprenol fosfato (Und-P), mediado por la enzima WecA (Rfe) (Fig. 2a). Luego ocurre la adición secuencial de los

monosacáridos (dTDP-ramnosa) al extremo no reducido de la molécula (Fig. 2a), proceso que tiene lugar en la cara citosólica de la membrana plasmática. Posteriormente, las subunidades de AgO son translocadas a través de la membrana, proceso que requiere de la proteína Wzx (RfbE) (Fig. 2b). En la cara periplásmica de la membrana, las subunidades son polimerizadas por la acción de Wzy (Rfc) (Fig. 2c), en un mecanismo que involucra la sucesiva adición del extremo reducido del polímero en formación, al extremo no reducido del monómero de AgO unido al undecaprenol fosfato (Und-P-P-azúcar). Finalmente, el polímero unido a Und-P es ligado en bloque al complejo lípido A-“core” por la enzima ligasa (WaaL) (Fig. 2e), liberándose el Und-P (Whitfield, 1995). El LPS completo, es posteriormente transportado a la membrana externa.

Que el polímero en formación continúe siendo elongado o se transfiera al lípido A-“core” para generar un LPS completo depende de la proteína Wzz o regulador del largo de cadena (Cld, Rol) (Fig. 2d), que determina la distribución modal o largo preferencial del antígeno O (Bastin *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Modelo de la vía de ensamblaje del antígeno O wzy dependiente. Modificado de Whitfield (1995). Los detalles se describen en el texto. El rectángulo rojo pequeño, representa una unidad de AgO.

*S. flexneri* posee dos reguladores del largo de cadena, de ellos, Wzz se encuentra codificado en el cromosoma mientras que Wzz<sub>pHS2</sub> está codificado en un plasmidio de 3 Kb llamado pHS-2 (Stevenson *et*

*al.*, 1995). Así, la actividad de estos reguladores determina dos largos preferenciales; una moda corta (S-AgO) que llega hasta 17 unidades repetidas, controlada por WzzB y una larga (VL-AgO) que alcanza aproximadamente las 90 unidades repetidas, controlada por Wzz<sub>pHS2</sub> (Stevenson *et al.*, 1995).

### 1.3. Control de la polimerización por Wzz.

El mecanismo de regulación de la polimerización de AgO por Wzz no ha sido totalmente dilucidado, sin embargo existen tres hipótesis. Bastin *et al.* (1993) han propuesto que Wzz y Wzy forman un complejo que tiene dos estados: uno que facilita la extensión del polímero y otro que facilita su transferencia al lípido A-“core”. Al comienzo de la polimerización, el complejo se encontraría en el estado de elongación, favoreciendo la interacción Wzz y Wzy, y cambiaría al estado de transferencia luego de un tiempo predeterminado. De esta forma, Wzz actuaría como un “reloj molecular” determinando el tiempo de elongación de la cadena. Por su parte, Morona *et al.* (1995) postularon que Wzz actuaría como una chaperona molecular, facilitando la interacción entre la polimerasa, la ligasa formando un complejo. La proporción específica entre la polimerasa y la ligasa en el complejo, determinaría la cinética de la reacción de ligación, permitiendo la producción de un AgO con un largo preferencial específico. La última hipótesis, fue descrita recientemente por Tocilj *et al.* (2008) quienes proponen que Wzz oligomeriza formando un punto focal, para organizar varias proteínas Wzy en su periferia, y el polímero se extiende de manera secuencial transfiriendo el intermediario unido al undecaprenol fosfato a las Wzy adyacentes. El tamaño del oligómero determinaría el número de proteínas Wzy en la periferia y en consecuencia el largo del polímero de AgO.

Independiente de cuál sea el mecanismo por el cual Wzz regula el largo del antígeno O, las tres hipótesis coinciden en que habría una interacción entre Wzz y Wzy. Algunos trabajos apoyan la hipótesis de Morona *et al.* (1995), pero indican que el blanco de regulación de Wzz sería Wzy y no la ligasa WaaL, ya que se comprobó que en *P. aeruginosa*, el largo de cadena se determina previo a la etapa de ligación (Daniels *et al.*, 2002) y en *E. coli*, la distribución modal del AgO se puede observar en ausencia de WaaL (Feldman *et al.*, 2005). Además, la sobreexpresión de Wzy puede alterar la distribución modal del AgO y alteraciones en los niveles de Wzz en bacterias que poseen dos reguladores puede favorecer la

producción de un largo de cadena sobre el otro, indicando que el balance correcto de estas proteínas es importante para observar el fenotipo silvestre de AgO (Daniels *et al.*, 1998). Recientemente, algunos autores (Guo *et al.*, 2006; Marolda *et al.*, 2006b) sugieren que existiría un complejo entre Wzy, Wzz y la translocasa Wzx.

#### **1.4. Modulación ambiental del AgO. Mecanismos y papel en la virulencia bacteriana.**

Actualmente se reconoce que el LPS es una estructura dinámica que presenta diversas modificaciones en respuesta a señales ambientales. En el caso de bacterias patógenas, los distintos microambientes a los que se enfrentan dentro del hospedero constituyen señales que llevan a cambios estructurales del LPS, los que favorecerían el establecimiento y la persistencia del patógeno en el organismo (Lerouge *et al.*, 2001; Preston & Maskell, 2002). Estudios realizados en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) han arrojado bastante información respecto a la regulación del LPS en enteropatógenos. Así, se ha definido que modificaciones en la porción del lípido A del LPS, mediado por la activación del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, permiten soportar la acción bactericida de péptidos catiónicos en el macrófago (Groisman, 2001; Moss *et al.*, 2000). Recientemente, se determinó que la expresión del gen *wzz* de *S. Typhimurium* es regulada por condiciones ambientales mediante los sistemas de dos componentes PmrA/PmrB y RcsC/YojN/RcsB (Delgado *et al.*, 2006). En otro reporte, Jimenez *et al.* (2008) demostraron que el gen *wzz* de *Aeromonas hydrophila* es regulado por temperatura, con un aumento sustancial de la transcripción a 20 °C comparado con 37 °C. Este cambio en la transcripción se refleja notoriamente en el perfil de LPS en ambas temperaturas y en la virulencia de la bacteria.

En cuanto al AgO, varios trabajos de la literatura han demostrado su importancia en la virulencia de *S. flexneri*. Así, se ha reportado que mutaciones que alteran el AgO afectan la capacidad de la bacteria de diseminarse en células epiteliales, debido a un defecto en la localización y función de la proteína IcsA (Hong & Payne, 1997; Morona *et al.*, 2003). Además, Van den Bosch & Morona (2003) sugieren que el AgO podría contribuir directamente a la diseminación intercelular mediada por IcsA. Por otra parte, el largo de cadena afecta la resistencia al suero de tal forma que el VL-AgO proporciona una mayor

resistencia que el S-AgO (Hong & Payne, 1997). No obstante, existe muy poca información respecto a los mecanismos involucrados en la regulación del antígeno O en *Shigella*. Sólo un trabajo ha informado el efecto de la temperatura sobre la distribución modal de las cadenas de AgO en *S. flexneri*: a 30 °C, habría una menor proporción de cadenas cortas de 1-2 unidades repetidas de AgO respecto a las moléculas con 11-16 unidades; en tanto que a 37 °C aumenta la proporción de cadenas cortas (Varela *et al.*, 2001). En otro reporte se investigó el efecto de distintas condiciones ambientales sobre la expresión del regulador del largo de cadena Wzz<sub>pHS2</sub> concluyendo que no es regulado por pH, temperatura o nutrientes (Hong & Payne, 1997).

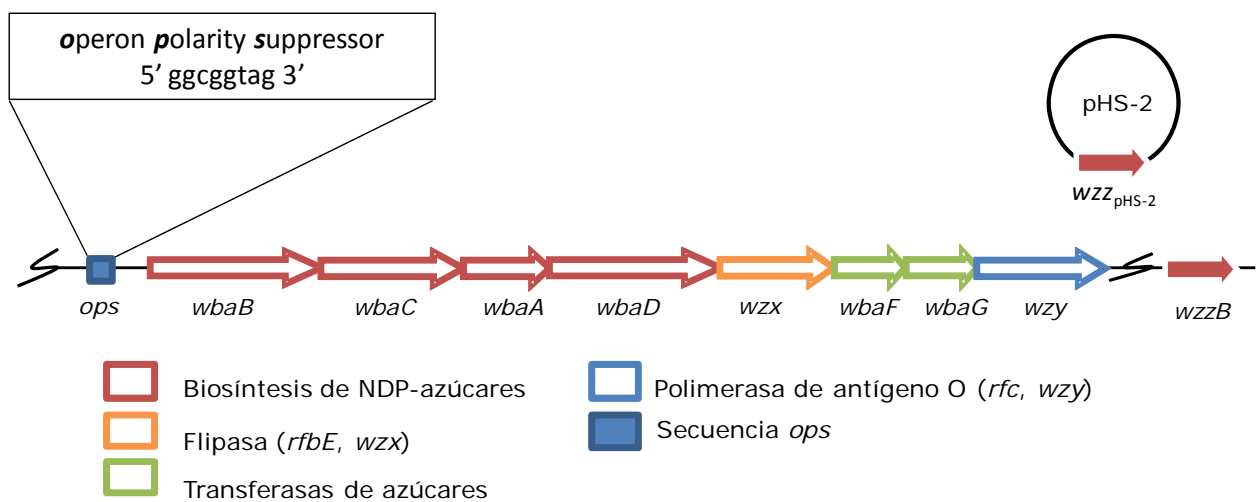
### 1.5. Regulación del AgO mediada por RfaH.

En nuestro laboratorio, se ha estudiado la regulación de la síntesis de AgO en enterobacterias. Es así, como hemos demostrado que en *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) Ty2, existe una expresión diferencial de la síntesis de AgO durante el crecimiento bacteriano, llegando a un máximo en fase estacionaria. Esta regulación es mediada por el antiterminador transcripcional RfaH, cuya expresión también aumenta en la transición a fase estacionaria (Bittner *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2001). RfaH regula positivamente la transcripción de diversos operones de distintas bacterias Gram negativo (Bailey *et al.*, 1997), actuando como un supresor de la polaridad y aumentando la procesividad de la enzima RNA polimerasa (Svetlov *et al.*, 2007). Entre los genes regulados por RfaH se encuentran los del “core” (*waa*) y el antígeno O (*wba*) del LPS, genes de hemolisinas, genes para la síntesis del pili F y genes de polisacáridos capsulares (Bailey *et al.*, 1992; Beutin & Achtman, 1979; Leeds & Welch, 1997; Pradel & Schnaitman, 1991; Rahn & Whitfield, 2003; Stevens *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de RfaH no ha sido totalmente aclarado, pero se ha demostrado que interactúa con una secuencia de 8 pb denominada *ops* (operon polarity suppressor) que se encuentra en la región 5'-UTR de todos los operones regulados por RfaH (Bailey *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1996). Se ha sugerido que la proteína unida a esta secuencia reconocería a la RNA polimerasa haciendo la transcripción resistente a la terminación, reduciendo las pausas durante la transcripción (Artsimovitch &

Landick, 2000; Svetlov *et al.*, 2007). El efecto de RfaH sobre la regulación del AgO en *S. flexneri*, aun no se ha estudiado.

En *S. flexneri*, los genes responsables de la síntesis del AgO se encuentran agrupados en el operón *wba* (Liu *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2003). Este operón ubicado entre los genes *galF* y *gnd* posee los genes para la biosíntesis y ensamblaje de los azúcares que formarán la unidad de AgO y además codifica para la flipasa (*wzx*) y la polimerasa del AgO (*wzy*) y presenta en su región 5' UTR una secuencia *ops* (Fig. 3).



**Figura 3.** Estructura genética del operón *wba* responsable de la síntesis del antígeno O en *S. flexneri* 2a 2457T. En paréntesis se muestran los nombres alternativos para algunos de estos genes. Además se indican los genes que codifican para los reguladores del largo de cadena *wzzB* cromosomal y *wzz<sub>pHS2</sub>* plasmidial localizado en el plasmidio pHS-2. (Hong & Payne, 1997; Liu *et al.*, 2008; Morona *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 2003).

Dado que existe una secuencia *ops* en el operón *wba*, es posible que RfaH regule la producción de AgO mediante la regulación de la transcripción de estos genes. Se ha descrito que RfaH, por su



actividad de antiterminador transcripcional, afecta principalmente genes distales (Artsimovitch & Landick, 2002; Bittner *et al.*, 2002), por lo tanto este efecto se vería mayormente en la polimerización del AgO, ya que el gen que codifica para la polimerasa del AgO (*wzy*) es el último gen de este operon (Morona *et al.*, 1994).

El conjunto de los antecedentes expuestos indican que: i) existe una secuencia *ops* en el operón *wba* en *S. flexneri*, necesarias para la función de RfaH y podría estar participando en la regulación de la síntesis de AgO, en una manera similar a lo descrito en *S. Typhi*. ii) Dado que *wzy*, es el último gen de este operón, su expresión podría ser influenciada por RfaH. iii) Debido a que existe sólo una polimerasa del AgO (Wzy) y se plantea la existencia de un complejo entre el regulador del antígeno O y la polimerasa (Wzz y Wzy), podría existir una competencia de los reguladores del largo de cadena por la polimerasa.

De acuerdo a lo anterior, en este Proyecto se plantean las siguientes **Hipótesis**:

1. La expresión de la polimerasa Wzy de *S. flexneri* es regulada en forma diferencial por el antiterminador transcripcional RfaH durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, y
2. La cantidad de Wzy es determinante para la modulación por los reguladores del largo de cadena WzzB cromosomal y Wzz<sub>pHS2</sub> plasmidial, lo que resulta en la expresión de antígeno O de tipo S-AgO o VL-AgO.

El **Objetivo General** es estudiar los mecanismos que regulan la expresión y actividad de la polimerasa del antígeno O en *S. flexneri*.

Los **Objetivos Específicos** son:

- 1- Determinar la función del gen *rfaH* en la síntesis de LPS en *S. flexneri*.
- 2- Determinar la regulación fase-dependiente del gen *rfaH* en *S. flexneri*.

3- Determinar la expresión del gen *wzy* y el nivel celular de la proteína Wzy en la cepa silvestre y en una mutante en *rfaH*.

4- Determinar la expresión de *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>* durante el crecimiento bacteriano.

5- Determinar el efecto de los niveles relativos de la polimerasa Wzy y los reguladores WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub> sobre la distribución modal del antígeno O.

6- Determinar la interacción entre la polimerasa Wzy y los reguladores WzzB o Wzz<sub>pHS2</sub>.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Reactivos.

De Applied Biosystems / Ambion (Austin, TX, EEUU) se obtuvo: TURBO DNA-Free DNasa.

De Fermentas (Hanover, MD, EEUU) se obtuvo: Estándares de peso molecular GeneRuler de 100pb y 1Kb.

De Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EEUU) se obtuvo: Oligonucleótidos.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: DNA polimerasa Taq, dTTP, dCTP, dATP, dGTP, oligonucleótidos, enzimas de restricción, SuperScript II, kit Platinum SYBR Green SuperMix UDG, bromuro de etidio.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo: Triptona, extracto de levadura, agar-agar, cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, glucosa, cloroformo, cloruro de potasio, glicerol, ácido clorhídrico, isopropanol, ácido acético glacial, ácido periódico, hidróxido de sodio, amoníaco, nitrato de plata, periodato de sodio, ácido bórico, formaldehído, alcohol isoamílico, fenol, acetato de sodio, metanol, etanol absoluto.

De Millipore (Billerica, MA, EEUU) se obtuvo: Filtros de nitrocelulosa de 0,025  $\mu$ m.

De Omega Bio-Tek (Doraville, GA, EEUU) se obtuvo: Kit de extracción plasmidial E.Z.N.A Plasmid Miniprep II.

De Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EEUU) se obtuvo: Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa, sustrato quimiolumincente SuperSignal West-Pico, película de exposición CL-XPosure, Reactivo para medir concentración de proteínas Coomassie Plus.

De Probac do Brazil (Sao Paulo, Brasil) se obtuvo: Suero polivalente anti *S. flexneri*.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: DNA ligasa T<sub>4</sub>, pGEM<sup>®</sup> – T Easy Vector System I y Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System, Go-Taq polimerasa, dNTP's, fosfatasa alcalina de camarón (SAP).

De Roche Applied Science (Indianapolis, IN, EEUU) se obtuvo: Reactivo de bloqueo para Western Blots, esferas de sefarosa.

De Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, EEUU) se obtuvo: Anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, anticuerpo secundario IRDye 680 anti-ratón, anticuerpo secundario IRDye 800 anti-conejo.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: Kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, arabinosa, ramnosa, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, xileno-cianol, proteinasa K, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranósido (X-Gal), ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), ribonucleasa A, acetato de amonio, anticuerpo anti-FLAG<sup>®</sup>.

De US Biological (Swampscott, MA, EE.UU) se obtuvo: Agarosa, dodecilsulfato de sodio (SDS), acrilamida, bisacrilamida, tris, tricina, glicina.

De Winkler Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo: Agua libre de nucleasas, fenol saturado básico y ácido.

## 2.2. Cepas bacterianas.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis.

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Fuente/ Referencia
<b><i>Shigella flexneri</i></b>		
2457T	<i>S.flexneri</i> 2a, cepa silvestre	I.S.P.*
MSF102	2457T $\Delta wzzB$	Este trabajo
MSF103	2457T <i>wzzB-FLAG3x</i> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF107	2457T $\Delta wzz_{pHS2}::aph$ , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF109	2457T <i>wzz<sub>pHS2</sub>-FLAG3x</i> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF117	2457T <i>wzy-FLAG3x</i>	Este trabajo
MSF114	2457T $\Delta wzy::aph$ , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF209	2457T $\Delta wzzB wzz_{pHS2}::aph$ , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF224	2457T <i>wzy-FLAG3x <math>\Delta wzz_{pHS2}::aph</math></i> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF487	2457T $\Delta rfaH$	Este trabajo
MSF488	2457T <i>rfaH-FLAG3x</i> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
MSF604	2457T <i>wzy-FLAG3x, <math>\Delta rfaH::cat</math></i>	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi 80 lacZ M15 endA recA hsdR(r_K m_K)$ <i>supE thi gyrA relA <math>\Delta(lacZYA-argF)</math> U169</i>	Stock del laboratorio

\* Instituto de Salud Pública.

## 2.3. Plasmidios.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente Tesis.

Plasmidio	Características	Fuente /Referencia
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> pSC101 oriT <sup>S</sup> , Amp <sup>R</sup> .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 ori <sub>R6K</sub> , Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup> .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 ori <sub>R6K</sub> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	<i>bla</i> <i>cat</i> cl857 IPR flp pSC101 oriT <sup>S</sup> , Cam <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> .	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pSUB11	Plasmidio para generar fusiones FLAG3x, ori <sub>R6K</sub> , Kan <sup>R</sup> .	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pGEM-T easy	Vector de clonamiento, Amp <sup>R</sup> .	Promega
pBAD24	Vector de clonamiento inducible por arabinosa, ori <sub>pMB1</sub> , Amp <sup>R</sup> .	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pSCRhaB2	Vector de clonamiento inducible por ramnosa, ori <sub>pBBR1</sub> , Tm <sup>R</sup> .	(Cardona & Valvano, 2005)
pFZY1	Vector de clonamiento sin promotor, F' <i>lac</i> replicon, <i>lacZ</i> <sup>+</sup> <i>Y</i> <sup>+</sup> <i>A</i> <sup>+</sup> Amp <sup>R</sup> .	(Koop <i>et al.</i> , 1987)
pCB315	pFZY1 que contiene un fragmento de 315 pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pCB261	pFZY1 que contiene un fragmento de 261 pb de la región intragénica del gen <i>rfaH</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pCB280	pFZY1 que contiene un fragmento de 280 pb de la región promotora del gen <i>wzz</i> <sub>pHS2</sub> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pCB326	pFZY1 que contiene un fragmento de 326 pb de la región promotora del gen <i>wzzB</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pCB-PhisG	pFZY1 que contiene un fragmento de 330 pb de la región promotora del gen <i>hisG</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-261	pGEM-T easy que posee un fragmento de 261pb de la región intragénica del <i>rfaH</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo

Plasmidio	Características	Fuente /Referencia
pGEM-PrfaH	pGEM-T easy que posee un fragmento de 315pb de la región promotora del gen <i>rfaH</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-PwzzB	pGEM-T easy que posee un fragmento de 326pb de la región promotora del gen <i>wzzB</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-Pcld	pGEM-T easy que posee un fragmento de 280pb de la región promotora del gen <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-PhisG	pGEM-T easy que posee un fragmento de 330pb de la región promotora del gen <i>hisG</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC75	pGEM-T easy que contiene el gen <i>rfaH</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, clonado con su promotor, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC114	pGEM-T easy que contiene el del gen <i>wzy</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC115	pBAD24 que contiene el ORF del gen <i>wzy-Flag3x</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC139	pGEM-T easy que contiene el del gen <i>wzzB</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC140	pGEM-T easy que contiene el ORF del gen <i>wzzB</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC141	pBAD24 que contiene el ORF del gen <i>wzzB</i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC146	pSCRhaB2 que contiene el ORF del gen <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> del plasmidio pHS2 presente en <i>S. flexneri</i> 2457T, Tm <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC144	pGEM-T easy que contiene el del gen <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> de <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJC147	pBAD24 que contiene el ORF del gen <i>wzz<sub>pHS2</sub></i> del plasmidio pHS2 presente en <i>S. flexneri</i> 2457T, Amp <sup>R</sup> .	Este trabajo

## 2.4. Partidores.

Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis.

Nombre	Partidor
Wrfah1-sf	atg caa tcc tgg tat tta ctg tac tgc aag cgc ggg <u>cg t gta ggc tgg agc tgc ttc g</u>
Wrfah2-sf	gaa ctc ggt gtt ctt cac act gtg ctt aat ctc ttt <u>atc ata tga ata tcc tcc tta g</u>
RfaH1-sf	atc cac cgg gag cgt gat ac
RfaH2-sf	acc acg gat gcc aat gtc aa
Wwzy-Sf1	ttt gct cca gaa gtg agg tta tta cta att tgg ata ttt <u>tac ata tga ata tcc tcc tta g</u>
Wwzy-Sf2	aaa att ttt ata aca ttt tta tgt att gaa ctg att att gtg <u>tgt agg ctg gag ctg ctt cg</u>
Wzy-sf-1	ata tag gca att tga tct tg
Wzy-sf-2	ctt ccc tat ttt taa cat cc
Fwzy-SF1	aaa tat cca aat tag taa taa cct cac ttc tgg agc aaa <u>aga cta caa aga cca tga cgg</u>
Fwzy-SF2	aaa aaa aga act ggt caa taa ctt ccc tat ttt taa cat <u>cca tat gaa tat cct cct tag</u>
WwzzB sf 1	gaa aat aat aat gtt tct ggg caa aac cat gac ccg gaa cca tat gaa tat cct cct tag
WwzzB-sf 2b	aga atc aag gtg att gcc ttt ttc gaa ctt <u>gta ggc tgg agc tgc ttc</u>
Wcld- 1sf	aat cac act cat ctt tct ggc ctc cat ggc atc acg taa <u>aca tat gaa tat cct cct tag</u>
Wcld-2sf	tta caa cat gtt gcc gaa tgg taa tga aga aat tga cct <u>tgt gta agg ctg gag ctg ctt cg</u>
FWzzB1-Sf	tgt gtt ggg gcg taa cgc tct gcg taa tta caa cgc gaa <u>gga cta caa aga cca tga cgg</u>
FWzzB2-Sf	gca tgg tgt cac cac cct gcc cgt ttc tct taa atg cac <u>aca tat gaa tat cct cct tag</u>
FwzzpHS2-1sf	acgtcatgcatggaggccagaaagatgagtgtgattgag <u>gac tac aaa gac cat gac gg</u>
FwzzpHS2-2sf	aac ttt tta taa aag ttg ctt ata aaa tga tgc atc agc <u>aca tat gaa tat cct cct tag</u>
FrfaH_2-sf	tgc caa tgt caa aac act gtt tgg gat tgc gtt tta gag <u>tca tat gaa tat cct cct tag</u>
FrfaH_1-sf	gat taa gca cag tgt gaa gaa cac cga gtt ccg caa act <u>cga cta caa aga cca tga cgg</u>
N-wzy-sf-Ndel	cat atg aat aat ata aat aaa at
C-wzy-sf- KpnI	ggt acc tta ttt tgc tcc aga agt ga
N-wzzB-sf-Ndel	cat atg cgg act tgg aaa ttt cc
C-wzzB-sf-KpnI	ggt acc tta ctt cgc gtt gta att ac



<b>Nombre</b>	<b>Partidor</b>
Nwzz <sub>pHS2</sub> sf-Ndel	cat atg aaa atc tca aag gtc tc
Cwzz <sub>pHS2</sub> sf-KpnI	ggt acc tta ctc aat cac act cat ct
wzzB-sf1	ata act tcc gtg cgt ctt ct
wzzB-sf2,	cct gcc cgt ttc tct taa at
wzz1-phs2	ccc aaa ccg atc gtc att ca
Wzz2-phs2	cct tcg aaa aac cac ctc cc
2916	cac ctt ggt acc atg aat aat ata aat aaa att ttt ata aca
2998	cag cct ggt acc cta ttt atc gtc gtc atc tt
3015	gtg ttc ttt cat atg aaa atc tca aag gtc tc
C Flag Ndel-b	ttt ttt cat atg cta ttt atc gtc gtc atc ttt g
CS pSCRhaB-1	cac gtt cat ctt tcc ctg gt
CS pSCRhaB-2	acg gcg ttt cac ttc tga gt
pBAD24-F	gat tag cgg atc cta cct ga
pBAD24-R	gac cgc ttc tgc gtt ctg at
SP6	att tag gtg aca cta tag aa
T7	taa tac gac tca cta tag gg
P57-2	cag agg cgg ata aaa gtg cg
RfaHint1	tgc ctt cca gcg tta ttc atc ag
RfaHint2	cgt tta ccc cgt acg att tt
PwzzB-1sf	ttc ttc aac tct cgc ctg ga
PwzzB-2sf	ggt cat ggt ttt gcc cag aa
Pwzz-1bsf	gaa agc gat cct gac gca tt
Pwzz-2sf	ggt aat gaa gaa att gac ct
Phisg-1	tca tta aac aaa tcc atc gc
Phisg-2	cat agc tat gcg taa acg ag
rfaH-1	gcc aga acc tta ttt gag gtc gta tt
rfaH-2	gtt ata ttt cat ggc gtc cat tgt a

Nombre	Partidor
RT-hisG1-sf	tga ctc acg cga att act gg
RT-hisG2-sf	gga taa gag gtg gcg ata cg
Rfc-1	tga tcc gac cat gta aag ca
Rfc-2b	tgt cgg tgc gat tat cag tt
wzzB1	tcagtctgctgaacctgtgg
Rcld-1	accagacaacacatcgtga

Las secuencias que aparean con zonas del plasmidio pKD3, pKD4 y psub11, están subrayadas (ver más adelante)

## 2.5. Medios y condiciones de cultivo.

Las bacterias se cultivaron a 37 °C en forma aeróbica en caldo Luria (CL, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L). Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en el mismo medio base conteniendo además 15 g/L de agar-agar. Aquellas cepas que poseían plasmidios de replicación termosensible (pKD46, pCP20) se incubaron a 30 °C. Cuando fue necesario curarlas de estos plasmidios, las cepas se crecieron sin selección a una temperatura no permisiva (42 °C). Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: Ampicilina (Amp) 100 µg/mL, kanamicina (Kan) 50 µg/mL, cloranfenicol (Cam) 20 µg/mL, trimetoprim (Tm) 50 µg/mL, ácido nalidíxico (Nal) 15 µg/mL. El indicador cromogénico para la actividad β-galactosidasa (X-Gal) se utilizó a una concentración final de 40 µg/mL. Todos los cultivos utilizados en los experimentos se sembraron a partir de un pre inóculo en fase estacionaria con una dilución 1:1.000.

## 2.6. Técnicas bioquímicas.

### 2.6.1. Análisis del lipopolisacárido en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina.

#### 2.6.1.1. Obtención de las muestras.

Se realizó como se describe en el método de Marolda *et al.* (2006). Las bacterias se cultivaron a 37 °C en condiciones aeróbicas. Cuando el cultivo llegó a la DO<sub>600</sub> deseada se tomó una alícuota y se centrifugó a 10.000 x g durante 2 min y las bacterias se resuspendieron en 1 mL de caldo fresco. Se midió la DO<sub>600</sub> y se tomó un volumen equivalente a 1,5 mL de bacterias ajustadas a una DO<sub>600</sub> de 2,0 y se centrifugó a 10.000 x g por 2 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 90 µL de tampón de lisis (SDS 2 %, β- mercaptoetanol 4 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,002 % en Tris 1 M pH 6,8) y se hirvió durante 15 min. Finalmente, a cada lisado se agregó 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 60 °C durante 1,5 h. Las muestras fueron conservadas a 4 °C.

### 2.6.1.2. Electroforesis.

Los geles de poliacrilamida se hicieron en una cámara mini-Protean III de acuerdo a la siguiente Tabla.

**Tabla 4.** Gel resolutivo para análisis de LPS.

Gel Resolutivo	14 %
ABA (49,5 %T, 6 %C)	1460 µL
Tampón de Gel	1660 µL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1400 µL
Glicerol	520 µL
TEMED	6 µL
APS 10%	100 µL
ABA (49,5 %T, 6 %C):23,25 gr. acrilamida y 1,5 g. bisacrilamida en 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Tampón de gel: Tris-HCl 3,0 M pH 8,45 y SDS 0,3 %	
Basado en la técnica descrito por Lesse <i>et al.</i> (1990)	

Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador.

**Tabla 5.** Gel concentrador para análisis de LPS.

Gel Concentrador	4 %
ABA (49,5 %T, 3 %C)	250 $\mu\text{L}$
Tampón de Gel	775 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	2000 $\mu\text{L}$
TEMED	6 $\mu\text{L}$
APS 10 %	75 $\mu\text{L}$
ABA (49,5 %T, 3 %C): 4,8 g. acrilamida y 0,15 g. bisacrilamida en 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

La cámara de electroforesis se llenó con solución anódica (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9) y catódica (Tris-HCl 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1 % pH 8,25). En los geles se cargaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra (LPS correspondiente a aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc) y la electroforesis se realizó a 50 Volts mientras las muestras permanecían en el gel concentrador (50 min aprox) y a 150 Volts cuando éstas entraron en el gel resolutivo (110 min aproximadamente).

#### 2.6.1.3. Detección del LPS mediante tinción con plata.

Se realizó según modificaciones del método de Tsai y Frasch (1982). El gel se fijó (5-16 h) en 200 mL de una solución 40 % etanol absoluto y 5 % ácido acético glacial. Se oxidó con agitación durante 10 min con 200 mL de una solución 40 % etanol absoluto, 5 % ácido acético glacial y 0,7 % ácido periódico o periodato de sodio. Se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se tiñó durante 15 min con 150 mL de una solución que contenía 1 g AgNO<sub>3</sub>, 2,8 mL NaOH 1 M y 2 mL Amoníaco 25 %. Nuevamente se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se reveló de 5 a 20 min (hasta coloración deseada) en 250 mL de una solución que contenía 12,5 mg ácido

cítrico monohidratado y 125 µL formaldehído 37 %. Finalmente la reacción se detuvo con al menos tres lavados de 5 min con H<sub>2</sub>O destilada.

#### **2.6.1.4. Detección del LPS mediante Western blot.**

Se realizó la transferencia del gel a una membrana de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot de BioRad. Primeramente, la membrana de PVDF se activó en metanol por 15 s para luego sumergirla en H<sub>2</sub>O destilada. La transferencia se realizó con tampón de transferencia (Glicina 1,44 %, Tris 0,3 %, y Metanol 20 % agregado sólo al momento de usar) por 70 min a 250 mA. La membrana, luego de ser transferida, se lavó 3 veces con TBS por 5 min y se bloqueó con 50 mL de una solución de leche descremada al 5 % en TBS (Tris 25 mM pH 8, NaCl 125 mM) o en 50 mL de una solución al 5 % del reactivo de bloqueo para Western blot (Roche) en TBS y se agitó suavemente por 90 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se incubó con suero de conejo polivalente anti *S. flexneri* (Probac do Brasil) diluido 1:100 en TBS a 4 °C toda la noche. Posteriormente se realizaron cinco lavados de 5 min con TBS. La incubación del segundo anticuerpo anti-conejo (Pierce) conjugado a peroxidasa de rábano, se realizó con una dilución 1:10.000 en TBS a temperatura ambiente por 2 h. La inmunoreactividad específica se detectó usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West-Pico, con exposición en película CL-XPosure, ambos de Pierce.

#### **2.6.1.5. Análisis densitométrico.**

El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa para imágenes UN-SCANT-IT (Silk Scientific). Se calculó la intensidad relativa de la razón entre la banda del lípido A-“core” y la intensidad de las bandas correspondiente al S-AgO y VL-AgO, midiendo los pixeles de una ventana pequeña ubicada al centro de cada carril. El análisis densitométrico se calibró determinando la razón entre la intensidad de la región del lípido A-“core” y la intensidad de las bandas de AgO utilizando un rango de volúmenes de LPS de *S. flexneri* 2a 2457T. El total de pixeles aumentó linealmente, en relación al volumen añadido, indicando que no hay saturación de las bandas en el rango de muestra utilizado.

### 2.6.1.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos de densitometría se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad software Inc.) con el test oneway ANOVA y el post test Tukey.

### 2.6.2. Medición de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

Las cepas bacterianas se cultivaron en 5 mL de CL a 37 °C durante toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para inocular 200 mL de CL fresco (dilución 1:1.000) con los antibióticos correspondientes y se incubó con agitación a 37 °C. Cada 30 min se tomó una alícuota de 1 mL y se midió la  $DO_{600}$ . Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada se tomaron alícuotas de 0,2 mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL con tampón Z ( $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$  60 mM,  $NaH_2PO_4 \times H_2O$  40 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  1 mM, pH 7,0 y  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM agregado al momento de usar). Las células se permeabilizaron con 20  $\mu$ L de  $CHCl_3$  y 10  $\mu$ L de SDS al 0,1 % agitando vigorosamente en vórtex durante 15 s. Se incubó a 30 °C durante 10 min y se agregó 0,2 mL del sustrato orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) (4 mg/mL). Al cabo de 15 min, la reacción se detuvo agregando 0,5 mL de  $Na_2CO_3$  0,5 M. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Miller, 1972):

$$Actividad (U Miller) = \frac{(Abs_{420nm} - 1,75 \times Abs_{550nm}) \times 1000}{Volumen (mL) \times Tiempo (min) \times Abs_{600nm}}$$

### 2.6.3. Obtención de proteínas.

Las cepas bacterianas se cultivaron en 5 mL de CL a 37 °C durante toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para inocular CL fresco (diluido 1:1.000) con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37 °C con agitación. Cuando las bacterias alcanzaban la densidad óptica deseada, se centrifugaban a 10.000 x g por 2 min o 4.000 x g por 10 min. El precipitado se lavó 2 veces con 1 mL de tampón fosfato 20 mM pH 6,5, suplementado con EDTA y PMSF a una concentración final de 1 mM y se resuspendió en el

mismo tampón. La lisis celular se realizó mediante sonicación en un equipo Microson XL2000 Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix) dos o tres veces por 15 s en hielo a intensidad media (13 watts). Posteriormente se centrifugó a 4 °C, a 8.000 x g por 5 min para descartar las células completas. Se recuperó el sobrenadante sin arrastrar el precipitado y luego se centrifugó a 4 °C, a 20.000 x g por 60 min. Las proteínas citosólicas se encontraban en el sobrenadante y las proteínas de membrana totales se encontraban en el precipitado formado. Ambas fracciones se separaron y la fracción citosólica fue rápidamente alicuotada y guardada a -60 °C. Se dejó aparte una pequeña fracción para determinar la concentración de proteínas. La fracción de membrana total se resuspendió en 40 µL de tampón fosfato 20 mM, pH 6.5, suplementado con PMSF 1 mM y se guardó a -60 °C.

#### **2.6.4. Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo Coomassie Plus (Pierce) según las indicaciones del fabricante. La absorbancia de las muestras se leyó a 595 nm. Se realizó una curva estándar, con concentraciones crecientes de BSA de 0 a 10 µg/mL.

#### **2.6.5. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas.**

Los geles de poliacrilamida se realizaron en una cámara mini-Protean III (BioRad) de acuerdo a la siguiente Tabla:

**Tabla 6.** Gel resolutivo para análisis de proteínas.

Gel Resolutivo	16 %	10 %
ABA (44:0,8)	4540 µL	2840 µL
10 % SDS	250 µL	250 µL
1,5 M Tris (pH8)	3120 µL	3120 µL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	4540 µL	6240 µL
APS 10 %	31 µL	31 µL
TEMED	25 µL	25 µL

Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador.

**Tabla 7.** Gel concentrador para análisis de proteínas.

Gel Concentrador	4 %
ABA (44:0,8)	500 $\mu\text{L}$
10 % SDS	50 $\mu\text{L}$
0,25 M Tris (pH 6,8)	2500 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1830 $\mu\text{L}$
APS 10 %	15 $\mu\text{L}$
TEMED	30 $\mu\text{L}$

Se utilizó tampón de corrida para proteínas (Glicina 1,44 %, Tris 0,3 %, SDS 0,1 %) y la muestra se cargó en tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,01 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %). La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V), hasta que el indicador del tampón de carga llegara al final del gel. Para visualizar las proteínas, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,1 %, metanol 45 %, ácido acético 10 %).

## 2.6.6. Ensayos de Western blot.

### 2.6.6.1. Transferencia y bloqueo.

Se realizó la transferencia a una membrana de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot de BioRad. Primeramente, la membrana de PVDF se activó en metanol por 15 s para luego sumergirla en H<sub>2</sub>O destilada. La transferencia se realizó con tampón de transferencia (Glicina 1,44 %, Tris 0,3 %, SDS 0,01 %, y Metanol 20 % agregado sólo al momento de usar) por 65 min a 230 mA.



La membrana, luego de ser transferida, se bloqueó con 50 mL de una solución de leche descremada 5 % en TBS (Tris 25 mM pH 8, NaCl 125 mM) o en 50 mL de una solución al 5 % del reactivo de bloqueo para Western blot (Roche) en TBS y se agitó suavemente por 90 min a temperatura ambiente.

#### **2.6.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia.**

La membrana se incubó con el primer anticuerpo ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 diluído 1:10.000 o anti-Wzz (donado por el Dr. Miguel Valvano) 1:2000 en TBS a 4 °C toda la noche. Luego de cinco lavados de 5 min en TBS, la membrana se incubó con el segundo anticuerpo anti-ratón (Rockland) o anti-conejo (Pierce) conjugado a peroxidasa de rábano (diluido 1:20.000) en TBS a temperatura ambiente por 2 h. Para la detección se usó el sustrato quimiolumincente SuperSignal West-Pico, con exposición en película CL-XPosure, ambos de Pierce.

#### **2.6.6.3. Inmunodetección por fluorescencia.**

La membrana se incubó con el primer anticuerpo ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 diluído 1:10.000 o anti-Wzz 1:2.000 en TBS a 4 °C toda la noche. Posteriormente se sometió a cinco lavados de 5 min con TBS. La incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón (IRDye<sup>®</sup> 680) o anti-conejo (IRDye<sup>®</sup> 800), se realizó con una dilución 1:20.000 en TBS a temperatura ambiente por 2 h protegido de la luz. La detección se realizó utilizando el sistema de detección infrarojo Odyssey Infrared Imager (Li-Cor Biosciences)

### **2.7. Estudio de interacción de proteínas.**

#### **2.7.1. Ensayos de entrecruzamiento.**

Se utilizaron 4 tipos de agentes entrecruzantes, DSG, DSP, EGS y formaldehído, cuyas características se describen en la siguiente Tabla:

**Tabla 8.** Agentes entrecruzantes.

Nombre	Distancia entre grupos reactivos	Reacciona con:	PM (g/mol)
DSG (Disuccinimidyl glutarate),	7,7 Å	Grupos aminos	326,26
DSP (dithiobis[succinimidylpropionate])	12 Å	Grupos aminos	404,42
EGS (Ethylene glycolbis (succinimidylsuccinate))	16,1 Å	Grupos aminos	456,36
Formaldehído	2 Å	Grupos aminos y tioles	30

#### 2.7.1.1. Entrecruzamiento *in vivo*.

El ensayo de entrecruzamiento *in vivo* se realizó según el método descrito por Daniles & Morona (1999), utilizando los agentes entrecruzantes DSP, DSG, EGS y formaldehído. Brevemente, las cepas bacterianas se cultivaron en 5 mL de CL a 37 °C durante toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para inocular 100 mL de CL fresco (dilución 1:1.000) con los antibióticos correspondientes y se incubó con agitación a 37 °C. Cuando el cultivo llegó a una  $DO_{600}$  de 1,0 se centrifugó y el precipitado se lavó 2 veces con tampón de entrecruzamiento (NaCl 150 mM, tampón fosfato 20 mM, pH 7,2). El precipitado se resuspendió en 10 mL (1/10 del volumen inicial). La suspensión se separó en 4 alícuotas con 2,5 mL cada una y se agregó el agente entrecruzante preparado en el momento, a una concentración final de 0,5 mM. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 37 °C por 45 min. Para detener la reacción se adicionó 7,5 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, se agitó y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó y el precipitado se lavó con 7,5 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 dos veces. Finalmente, el precipitado obtenido se mantuvo a -20 °C para su posterior procesamiento por sonicación (ver 2.6.3) y análisis por Western blot (2.6.6).

### 2.7.1.2. Entrecruzamiento *in vitro*.

El entrecruzamiento *in vitro* se realizó según el protocolo descrito por Scott *et al.* (2002), utilizando los agentes entrecruzantes DSP, DSG, EGS y formaldehído. Las cepas bacterianas se cultivaron en 5 mL de CL a 37 °C durante toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para inocular 100 mL de CL fresco (dilución 1:1.000) con los antibióticos correspondientes y se incubó con agitación a 37 °C. Cuando el cultivo llegó a una  $DO_{600}$  de 1,0, las bacterias se colectaron y lavaron para obtener proteínas de membrana según lo descrito anteriormente (ver 2.6.3). Luego se tomaron 500  $\mu$ g de las proteínas y se llevaron a un volumen final de 50  $\mu$ L con tampón fosfato 20 mM, pH 6,5, suplementado con PMSF 1 mM. Posteriormente se agregó el agente entrecruzante a una concentración final de 0,5 mM y se incubó en hielo por 2 h. Para detener la reacción se agregó 100  $\mu$ L de una solución 75 mM Tris-HCL pH 7,4 y se agitó vigorosamente en vortex durante 5 s. Se incubó por 10 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 4 °C por 60 min a 20.000 x g. Se recuperó el precipitado, se resuspendió en 40  $\mu$ L de tampón fosfato 20 mM, pH 6,5, suplementado con PMSF 1 mM y se midió la concentración de proteínas según 2.6.4. Posteriormente las muestras se analizaron mediante Western blot.

### 2.7.2. Ensayos de inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación se realizó utilizando esferas de agarosa cubiertas con proteína-G (Roche). Para esto, se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión de esferas, se centrifugó por 3 s y se descartó el sobrenadante. Se lavó 2 veces con 500  $\mu$ L de PBS. Posteriormente se mezclaron las esferas en 500  $\mu$ L de PBS con 5  $\mu$ g de anticuerpo anti-FLAG® M2. Se agitó por rotación a 4 °C por 2 h. Luego, se centrifugó por 3 s y descartó el sobrenadante. Se resuspendieron en 200  $\mu$ L PBS y se separó en dos tubos con 100  $\mu$ L cada uno. A cada tubo se agregó 250  $\mu$ g de proteínas de membrana (stock preparado  $\cong$  10  $\mu$ g/ $\mu$ L) de la cepa silvestre o la cepa *wzy*-FLAG (MSF117) y se incubó a 4 °C por 2 h con rotación. Después se centrifugaron las esferas por 3 s y se descartó el sobrenadante. Se lavó tres veces con PBS y finalmente las proteínas se eluyeron con tampón de elución (glicina 0,2 M pH 2,8). Las proteínas recuperadas se incubaron 30 min a 45 °C en tampón de carga de proteínas y se analizaron mediante Western blot.

## **2.8. Técnicas básicas de biología molecular.**

### **2.8.1. Purificación de ácidos nucleicos.**

#### **2.8.1.1. Extracción de DNA cromosomal.**

Las cepas se cultivaron en 5 mL de CL durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se centrifugó 1 mL de cultivo por 2 min a 10.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 560 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Se agregó 30 µL de SDS 10 % y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL). La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 1 h a 37 °C. Luego se agregó ½ volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y ½ volumen de fenol saturado básico. Se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión y se centrifugó 5 min a 10.000 x g. La fase acuosa (superior), que contiene el DNA cromosomal, fue transferida a un tubo limpio y el DNA se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó por inversión seis veces y se dejó durante 20 min a -20 °C. Se centrifugó 15 min a 10.000 x g y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70 % frío, se centrifugó por 5 min a 10.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA se resuspendió en 100 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

#### **2.8.1.2. Extracción de DNA plasmidial.**

Para la extracción de plasmidios con un alto número de copias se utilizó el kit E.Z.N.A Plasmid Miniprep II de Omega Bio-Tek siguiendo las indicaciones del fabricante. Para extraer el plasmidio pFZY1 y sus derivados (bajo número de copias) se utilizó un método de extracción alcalina. Las cepas se cultivaron en 25 mL de CL durante toda la noche a 37 °C con agitación y las bacterias se colectaron por centrifugación. El precipitado se resuspendió en 800 µL de solución de lisis estéril (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) suplementado con RNAsa 100 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La suspensión se traspasó a tubos eppendorf (200 µl cada uno) y se procesaron en paralelo como sigue. Se agregó 400 µL de solución denaturante (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) preparada en el

momento, se agitó suavemente y se dejó en hielo durante 20 min. Luego, se agregó 300  $\mu$ L de acetato de amonio 7,5 M, se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 20 min. Se centrifugó 10 min a 8.000 x g y se recuperó 800  $\mu$ L del sobrenadante. El DNA plasmidial se precipitó con 500  $\mu$ l isopropanol por 20 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó por 15 min a 10.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500  $\mu$ L de etanol 70 % frío. Se centrifugó 5 min a 10.000 x g, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA plasmidial de las cuatro alícuotas se resuspendió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

#### **2.8.1.3. Purificación de DNA desde un gel de agarosa.**

Luego de la electroforesis y la tinción con bromuro de etidio (ver 2.8.2.1), se cortaron del gel de agarosa las bandas de DNA a purificar utilizando una hoja de bisturí estéril. El DNA se extrajo siguiendo las instrucciones del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System de Promega.

#### **2.8.1.4. Extracción de RNA total.**

Las bacterias se cultivaron con agitación en 50 mL de CL. Cada 30 min se tomó una alícuota y se midió la DO<sub>600</sub>. Se tomaron alícuotas de 5 mL y 500  $\mu$ L cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0,1) o estacionaria (DO<sub>600</sub> 1,5) de crecimiento, respectivamente. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación durante 2 min a 10.000 x g y se resuspendieron en 80  $\mu$ L de una solución de lisozima (1mg/mL) por 5 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo se agregó 1 mL de TRIzol™ y se homogeneizó agitando en vortex por 10 s. Posteriormente se incubó 5 min a temperatura ambiente, se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s (hasta emulsión rosada) y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 12.000 x g por 15 min, se recuperó la fase acuosa y se llevó a un tubo nuevo. Se agregaron 0,5 mL de isopropanol y se dejó precipitar el RNA a temperatura ambiente por 10 min. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 12.000 x g por 10 min obteniendo el precipitado de RNA, que fue lavado con 0,5 mL de etanol 75 % (en H<sub>2</sub>O-DEPC). Finalmente se centrifugó a 7.500 x g por 5 min, se dejó secar al aire parcialmente y se resuspendió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O-DEPC. La concentración se determinó por medición espectrofotométrica de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$RNA(\mu g/mL) = (Abs_{260}) \times (40 \mu g/mL) \times Factor\ de\ diluci3n$$

La integridad del RNA extraído fue determinada mediante análisis en geles denaturantes de formaldehído/agarosa al 1,0 %. La calidad del RNA se determinó mediante análisis de la razón de las absorbancias a 260 y 280 nm, de manera de analizar el nivel de contaminación con proteínas de las respectivas muestras. Una razón  $A_{260/280}$  igual o superior a 1,8 indica un RNA puro.

## **2.8.2. Electroforesis de ácidos nucleicos.**

### **2.8.2.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Los geles se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0,7 % y 1,5 % en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de tampón Blue II 10X (glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,25 %, xilen cianol 0,25 %, EDTA 100 mM) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V constantes y luego el gel se tiñó por 5 min en una solución de bromuro de etidio (5  $\mu$ g/mL). Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV, utilizando una cámara Polaroid y película Polaroid 667 o una cámara digital (Vilber Lourmat).

### **2.8.2.2. Electroforesis de RNA en geles denaturantes.**

Se preparó un gel de agarosa al 1 % en tampón MOPS 1X (MOPS 40mM, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7) y formaldehído al 18 %. La mezcla formaldehído-tampón se precalentó a 65 °C y luego se agregó a la agarosa disuelta en agua DEPC. Se dejó gelificar en una campana de extracción. El RNA a analizar (5  $\mu$ L) fue mezclado con 7  $\mu$ L de solución A (que contiene 200  $\mu$ L de MOPS 10X y 450  $\mu$ L de agua DEPC), 7  $\mu$ L de solución B (350  $\mu$ L formaldehído, 1 mL de formamida) y 1  $\mu$ L de solución de carga (300  $\mu$ L de glicerol, 700  $\mu$ L de agua DEPC, 2,5 mg de azul de bromofenol y 2,5 mg de azul de xilen cianol). Las muestras fueron denaturadas a 100 °C durante 10 min y se cargaron en el gel de agarosa

formaldehído. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en campana de extracción a un voltaje constante de 70 V, durante aproximadamente 2 h. Se tiñó por 3 min en una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) y se destiñó por 30 min en agua destilada.

### **2.8.2.3. Análisis densitométrico de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.**

Una vez obtenida la fotografía del gel, como se describe en el punto 2.8.2.1., se realizó una densitometría de píxeles utilizando el programa UN-SCAN-IT de Silk Scientific. De este modo, se pudo determinar la concentración de las muestras analizadas mediante comparación con el estándar de peso molecular GeneRuler de Fermentas.

### **2.8.3. Digestión con enzimas de restricción.**

Estos ensayos se realizaron utilizando los protocolos sugeridos por el proveedor. La eliminación de la enzima de restricción se realizó mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System de Promega. Cuando esto no fue posible, la mezcla de reacción se trató con ½ volumen de fenol y ½ volumen de cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). Se agitó vigorosamente hasta emulsión y centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. La fase acuosa, libre de proteínas, se trasladó a un tubo nuevo y el DNA se precipitó a -20 °C utilizando 0,1 volúmenes de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el DNA precipitado se sedimentó, se lavó y resuspendió en un volumen adecuado de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

## **2.9. Transformación de plasmidios o productos de PCR.**

Para transformar una cepa bacteriana, se prepararon células electrocompetentes: las bacterias se cultivaron a 37 °C en CL con agitación hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5. Se centrifugó 3 mL del cultivo a 10.000 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente a 10.000 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

Se mezclaron 50  $\mu$ L de células electrocompetentes con DNA plasmidial o producto PCR previamente dializado en filtros de nitrocelulosa de 0,025  $\mu$ m (Millipore) y se electrotransformó en un electroporador “*E. coli* Pulser™” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 KVolts. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de CL y se incubó a 30 °C ó 37 °C por 60 min. Luego, se sembró 100  $\mu$ L de las células transformadas en placas de AL con Amp y se incubó toda la noche a 30 °C ó 37 °C dependiendo del plasmidio. Finalmente se seleccionaron los clones mediante resistencia a antibióticos otorgada por el material transformado.

## **2.10. Obtención de mutantes en *S. flexneri* 2457T.**

### **2.10.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis.**

Se diseñaron partidores de aproximadamente 50 ó 60 pb, cuyos extremos 5' contenían 30 ó 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen a mutar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos cuya secuencia aparee perfectamente con aquellas presentes en el plasmidio pKD4 o pKD3 y permiten amplificar el casete génico compuesto por el gen *aph* ( $\text{kan}^R$ ) o *cat* ( $\text{cam}^R$ ), respectivamente, flanqueado por la secuencia FRT (Tabla 2). La amplificación de este casete se realizó utilizando los partidores descritos en la Tabla 3. Para la delección de los genes *rfaH*, *wzy*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>* se utilizaron las parejas de partidores i) *WrfaH1* y *WrfaH2*, ii) *Wwzy1* y *Wwzy2*, iii) *WwzzB1* y *WwzzB2*, iv) *Wcld-1sf* y *Wcld-2sf* respectivamente.

Los amplicones se verificaron mediante electroforesis y se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 95 % frío, para ser finalmente resuspendidos en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### **2.10.2. Mutagénesis.**

La mutagénesis se realizó mediante el método de reemplazo alélico con productos de PCR, descrito por Datsenko & Wanner (2000).



La mutagénesis se realizó sobre *Shigella flexneri* 2457T, transformada mediante electroporación con el plasmidio termosensible pKD46 (Tabla 2). Éste contiene los genes que codifican para las subunidades de la recombinasa Red del fago  $\lambda$  bajo el control del promotor inducible por arabinosa  $P_{ara}$ . La cepa *S. flexneri*/pKD46 se creció a 30 °C con agitación, hasta una  $DO_{600}$  de 0,6 en 20 mL de CL con Amp (100  $\mu$ g/mL) y L-arabinosa (10 mM) para inducir la expresión de la recombinasa Red. Estas bacterias se utilizaron para transformarlas mediante electroporación con el producto PCR concentrado y dializado. Las transformantes fueron recuperadas en CL a 37 °C por 2 h para luego ser seleccionadas a 37 °C en placas de AL suplementadas con Kan o Cam. El plasmidio pKD46 se eliminó sembrando sucesivamente las transformantes en placas de AL con Kan o Cam a 42 °C. Finalmente se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Kan o Cam y sensibles a Amp.

El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante PCR utilizando partidores que apareaban en regiones externas al sitio del reemplazo (Tabla 3). Como templado se utilizó 2  $\mu$ L de la suspensión que resulta al resuspender una colonia en 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada. La reacción se hizo de la siguiente manera:

Tampón de PCR 10X	1	$\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,3	$\mu$ L
dNTP's 10 mM	0,2	$\mu$ L
Partidor 1 (25 pmol/ $\mu$ L)	0,2	$\mu$ L
Partidor 2 (25 pmol/ $\mu$ L)	0,2	$\mu$ L
Suspensión de bacterias	2	$\mu$ L
H <sub>2</sub> O	6	$\mu$ L
Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ L)	0,1	$\mu$ L

La amplificación se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Como control se realizó la reacción de PCR utilizando una suspensión de la cepa silvestre.

### 2.10.3. Eliminación del casete de resistencia.

Una vez verificada la inserción del casete de resistencia y la pérdida del plasmidio pKD46, se transformaron las diferentes cepas mutantes con el plasmidio pCP20 (Amp<sup>R</sup>, Cam<sup>R</sup> ori<sup>TS</sup>, Tabla 2). Este plasmidio tiene clonado el gen que codifica para la recombinasa FLP, que recombina en sitios FRT, lo que permite eliminar los genes de resistencia a antibiótico de las diferentes mutantes dejando una copia del sitio FRT y una deleción en el gen interrumpido. Se seleccionaron varias colonias transformadas con el plasmidio pCP20 y se sembraron por triplicado en placas de AL, AL con Amp y AL con Kan o Cam y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Esto se repitió hasta obtener bacterias mutantes que crecieran sólo en la placa de AL con Amp, indicando pérdida de la resistencia y presencia del plasmidio pCP20. Luego, se sembraron a 42 °C hasta obtener mutantes que crecieran sólo en la placa de AL indicando pérdida del plasmidio pCP20 y del casete de resistencia (Kan o Cam).

### 2.10.4. Construcción de doble mutantes.

La construcción de doble mutantes se llevó a cabo utilizando las cepas con mutaciones simples a las cuales se les eliminó el gen de resistencia. La segunda mutagénesis se realizó de acuerdo a lo descrito en los puntos 2.10.1 y 2.10.2.

### 2.10.5. Construcción de fusiones FLAG3x.

Se diseñaron partidores de aproximadamente 50 o 60 pb, cuyos extremos 5' contenían 30 o 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean la región a modificar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos cuya secuencia aparee perfectamente con aquellas presentes en el plasmidio pSUB11. Este plasmidio posee la secuencia que codifica para el epítopo FLAG3x además del gen de selección *aph* (kan<sup>R</sup>) flanqueado por la secuencia FRT (Tabla 2). La amplificación de este casete se realizó utilizando los partidores descritos en la Tabla 3 Se realizaron las fusiones de la secuencia para el epítopo FLAG3x con el gen *rfaH*, *wzy*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>* con las parejas de partidores i) FrfaH\_1-sf y FrfaH\_2-sf, ii) FWZY-sf1 y FWZY-sf2, iii) FwzzB1-sf y FwzzB2, iv) FwzzpHS2-1sf y FwzzpHS2-2sf, respectivamente.

Los amplicones se verificaron mediante un gel de agarosa y se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 95 % frío, para ser finalmente resuspendidos en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

La fusión traduccional se realizó sobre *Shigella flexneri* 2457T transformada con el plasmidio termosensible pKD46 de manera similar a la mutagenesis descrita en el punto 2.10.2.

### 2.11. Construcción de plasmidios de expresión.

Los genes de interés se clonaron en el vector comercial pGEM T-Easy y en los vectores inducibles por arabinosa y ramnosa, pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995) y pSCRhaB2 (Cardona & Valvano, 2005) respectivamente. Ambos vectores inducibles son reprimidos por glucosa.

Para amplificar los genes se utilizó como templado una muestra de DNA de la cepa *S. flexneri* 2457T y los partidores descritos en la Tabla 3.

#### 2.11.1. Construcción de plasmidios utilizando el sistema pGEM T-Easy.

En el vector pGEM T-Easy se clonaron los genes *rfaH*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>*, cada uno con su promotor (250 pb de su región 5'-UTR) o solamente el marco de lectura de *wzy*. Para obtener los productos PCR de los genes *rfaH*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>* y *wzy*, se utilizaron las parejas de partidores i) *rfaH1-sf* y *rfaH2-sf*, ii) *wzzB-sf1* y *wzzB-sf2*, iii) *wzz1-pHS2* y *wzz2-pHS2* iv) i) N-*wzy-sf*- NdeI y C-*wzy-sf*-KpnI, respectivamente y dna de *S. flexneri* 2457T. El producto de PCR obtenido se purificó mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System de Promega y se ligó directamente en el vector pGEM-T easy según las indicaciones del fabricante. La mezcla de ligación se usó para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes. Las transformantes se seleccionaron sobre placas de AL suplementadas con Amp (100  $\mu$ g/mL) y X-gal (40  $\mu$ g/mL) y se escogieron las colonias blancas resultantes de la transformación. La presencia del inserto de comprobó mediante PCR utilizando los partidores SP6 y T7. Se extrajeron los plasmidios de 10 clones seleccionados y se digirieron con la enzima de restricción EcoRI para reconfirmar la presencia del inserto. Mediante este método se obtuvieron los plasmidios pJC75, pJC139, pJC144 que contenían los genes *rfaH*, *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>* con su promotor y pJC114 con el ORF de *wzy*.

### 2.11.2. Clonamiento en el vector pBAD24.

Primero se amplificó el marco de lectura de *wzzB* o *wzz<sub>pHS2</sub>* utilizando partidores N-*wzzB*-sf-NdeI y C-*wzzB*-sf-KpnI o N-*wzzpHS2*-sf-NdeI y C-*wzzpHS2*-sf-KpnI y DNA cromosomal o plasmidial de *S. flexneri* 2457T. Los fragmentos se clonaron en el vector pGEM T- Easy, dando origen al plasmidio pJC140 y pJC145. Posteriormente se liberó el ORF de interés del mediante digestión con EcoRI y al mismo tiempo se digirió, el vector pBAD24 con la misma enzima. Para clonar el gen *wzy*, se amplificó el ORF utilizando los partidores 2916 – 2998 y DNA de la cepa MSF117 (*wzy*-Flag3x). El producto PCR, al igual que el vector pBAD24 se digirió con la enzima KpnI. Luego los vectores digeridos se desfosforilaron según las indicaciones del proveedor, utilizando la enzima SAP (Promega). El inserto y el vector purificado, se analizaron en un gel de agarosa 1 % y se cuantificó mediante densitometría utilizando como estándar el marcador de peso molecular Fermentas 1 kB. La reacción de ligación se realizó utilizando la enzima T4 DNA Ligasa según las instrucciones del proveedor. Una alícuota de la mezcla de ligación se dializó y se usó para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes. Las transformantes se seleccionaron sobre placas de AL suplementadas con Amp (100  $\mu$ g/mL) y glucosa (0,2 %). Posteriormente, se analizaron los clones mediante PCR para determinar si tenían la inserción del fragmento de interés con los partidores pBAD24-F y pBAD24-R. La orientación del gen clonado se determinó por PCR, utilizando un partidor interno del gen *wzzB* (*wzzB*-1), *wzz<sub>pHS2</sub>* (*Rcld*-1), o *wzy* (*rfc*-1) con uno del vector (pBAD24-F). De esta forma, se dio origen al plasmidio pJC141 (pBAD24-*wzzB*), pJC147 (pBAD24-*wzz<sub>pHS2</sub>*) y pJC115 (pBAD24-*wzy*-Flag3x).

### 2.11.3. Clonamiento en el vector pSCRhaB2.

Para clonar en el vector pSCRhaB2, se realizó un PCR con los partidores 3015 – C Flag NdeI-b y se digirió el producto con la enzima de restricción NdeI según las recomendaciones del proveedor. Al mismo tiempo se digirió el vector con la misma enzima y se purificó. Luego el vector se desfosforilo, según las indicaciones del proveedor, utilizando la enzima SAP (Promega). El inserto y el vector se analizaron en un gel de agarosa 1 % y se cuantificó mediante densitometría utilizando como estándar el

marcador de peso molecular Fermentas 1 kb. La reacción de ligación se realizó utilizando la enzima T4 DNA Ligasa según las instrucciones del proveedor, y se usó para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes. Las transformantes se seleccionaron sobre placas de AL suplementadas con Tm (50  $\mu$ g/mL) y glucosa (0,2 %). Posteriormente, se analizaron los clones mediante PCR para determinar inserción del fragmento de interés con los partidores CS-pSCRhaB-1 y CS-pSCRhaB-2. La orientación del gen clonado se determinó por PCR, utilizando un partidador interno del gen (RclD-1) con uno del vector (CS-pSCRhaB-1). De esta forma se generó el plasmidio pJC146.

#### **2.11.4. Secuenciación de plasmidios.**

Los plasmidios fueron purificados según lo descrito en la sección 2.8.1.2. La concentración de cada uno fue estimada mediante densitometría desde geles de agarosa al 0,7 % utilizando el estándar de peso molecular de 1 kb GeneRuler de Fermentas. Los cromatogramas obtenidos del Servicio de Secuenciación MacroGen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) fueron analizados con el programa FinchTV de Geospiza Inc.

#### **2.11.5. Ensayos de inducción o represión.**

La inducción de los genes clonados en los vectores inducibles, se realizó con la adición de arabinosa o ramnosa (para los plasmidios pJC141 o pJC146, respectivamente) a una concentración final de 0,02 % ó 0,2 % en el medio de cultivo. Se tomó una alícuota de un cultivo en fase estacionaria y se inoculó (dilución 1:1.000) en 20 mL de medio fresco, suplementado con los antibióticos correspondientes y el inductor. Luego de 3 h de incubación a 37 °C con agitación ( $DO_{600} \cong 0,6$ ) , se recolectó el cultivo y se prepararon muestras de LPS. La represión se realizó de la misma forma pero con adición de glucosa a una concentración final de 0,2 % ó 0,02 %.

### **2.12. Determinación de la actividad de los promotores de los genes *rfaH*, *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>*.**

#### **2.12.1. Clonamiento de las regiones promotoras de los genes *rfaH*, *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>*.**

Se amplificaron mediante PCR fragmentos que poseían las regiones promotoras de los genes *rfaH*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>* e *hisG*, además de la región intragénica del gen *rfaH*, usada como control negativo. El promotor de *hisG*, se utilizó como control interno, ya que su expresión es constante durante el crecimiento bacteriano. Para la amplificación de los promotores, se utilizaron los partidores i) RfaH2 y RfaHint2, ii) PwzzB-1sf y PwzzB-2sf iii) Pwzz-1bsf y Pwzz-2sf, iv) PhisG-1 y PhisG2 y iv) rfaH-1 y rfaH-int1 para *rfaH*, *wzzB*, *wzz<sub>pHS2</sub>*, *hisG* y la región intragénica del gen *rfaH* respectivamente (Tabla 3).

Los productos de PCR se ligaron en el vector pGEM-T Easy de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor (ver 2.11.1), se transformaron en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  y las colonias blancas fueron seleccionadas en placas de AL con Amp (100  $\mu$ g/mL) y X-gal (40  $\mu$ g/mL). Se confirmó la presencia del inserto esperado por PCR y análisis de restricción del vector. Los plasmidios fueron denominados pGEM-PrfaH, pGEM-PwzzB, pGEM-Pcld, pGEM-hisG y pGEM-261 (ver Tabla 2).

### 2.12.2. Construcción de fusiones transcripcionales.

Para construir las fusiones transcripcionales *rfaH-lacZ*, *wzzB-lacZ*, *wzz<sub>pHS2</sub>-lacZ*, *hisG-lacZ* y *261-lacZ* (control) se clonaron los fragmentos correspondientes a las regiones promotoras en el vector de copia única pFZY1, que contiene el operón *lac* sin su promotor. Con este objeto, los plasmidios pGEM-PrfaH, pGEM-PwzzB, pGEM-Pcld, pGEM-PhisG y pGEM-261 y el vector pFZY1 se digirieron con la enzima de restricción EcoRI. El vector pFZY1 cortado se desfosforiló utilizando la enzima fosfatasa alcalina CIAP según las instrucciones del proveedor. Los fragmentos liberados enzimáticamente del pGEM-T fueron purificados desde geles de agarosa y posteriormente ligados al vector pFZY1 siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta mezcla se utilizó para transformar la cepa DH5 $\alpha$  y los clones se seleccionaron por la resistencia a Amp del vector. La presencia y orientación del inserto se verificó mediante PCR utilizando el partidador p57-2 que apareca en el gen *lacZ* del vector y los partidores correspondientes (Tabla 3) que aparean desde las respectivas regiones promotoras. Se seleccionó un clon de cada construcción. Las construcciones fueron denominadas pCB315, pCB280, pCB326, pCBhisG y pCB261 (Tabla 2).

Posteriormente, los plasmidios se electrotransformaron en las cepas de *S. flexneri* silvestre (2457T) o *S. flexneri*  $\Delta rfaH$  (MSF487) y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa como se describe en el punto 2.6.2.

### **2.12.3. Secuenciación de las regiones promotoras.**

La identidad de las regiones clonadas en el vector de copia única pFZY1 fue comprobada mediante secuenciación desde productos de PCR de los mismos. Los productos de PCR fueron purificados desde geles de agarosa al 1 % mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System de Promega. La concentración de cada uno fue estimada mediante densitometría desde geles de agarosa al 1,5 % utilizando el estándar de peso molecular de 100 pb GeneRuler de Fermentas. Los cromatogramas obtenidos del Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad Católica fueron analizados con el programa FinchTV de Geospiza Inc.

### **2.13. Determinación del nivel celular del transcrito del gen *wzy* mediante RT-PCR en Tiempo Real (qPCR).**

Se extrajo RNA como se describe en el punto 2.8.1.4.

#### **2.13.1. Digestión con DNasa I.**

El RNA total extraído fue tratado con la enzima Turbo DNase (Ambion) de manera de eliminar el DNA genómico contaminante. Las reacciones de digestión se prepararon de la siguiente forma:

RNA total		60 $\mu$ g
Tampón 10X		30 $\mu$ L
DNasa I Ambion		10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O-DEPC	csp	300 $\mu$ L

Se incubó por 3-4 h a 37 °C. Posteriormente el RNA fue purificado mediante dos extracciones con ½ volumen fenol y ½ volumen cloroformo (para eliminar la DNasa) y luego con una extracción con 1 volumen de cloroformo (de manera de eliminar residuos contaminantes de fenol). El RNA purificado fue resuspendido en 40-50 µL de H<sub>2</sub>O y su integridad y calidad fue analizada mediante geles denaturantes de formaldehído/agarosa y absorbancia espectrofotométrica.

### 2.13.2. Transcripción inversa.

Para esta reacción se utilizó la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) como se describe a continuación. Primero se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:

RNA total purificado	5 µg
Partidor Especifico	2 pmoles
dNTPs 10 mM	1 µL
H <sub>2</sub> O	csp 13 µL

Se denaturó la mezcla a 65 °C por 5 min para luego agregar sobre hielo 4 µL de Tampón primera hebra 5X (Invitrogen) y 2 µL de DTT 0,1 M. Esta mezcla se incubó a 42 °C por 2 min para luego agregar, en caliente, 1 µL de SuperScript II (200 U/µL) Invitrogen. La reacción se mantuvo a 42 °C por 50 min para finalmente detenerla calentando a 70 °C por 15 min. Además se incluyó un control en el cual se reemplazó la enzima SuperScript II por H<sub>2</sub>O. Este control permite confirmar la total eliminación de cualquier rastro de DNA contaminante.

### 2.13.3. Optimización de los ensayos de RT-PCR en Tiempo Real.

Se definieron las condiciones óptimas de amplificación para *hisG* y *wzy* de manera de evitar cualquier problema de amplificación inespecífica o de formación de dímeros de partidores durante las reacciones de PCR, que pudieran alterar el análisis y confiabilidad de los valores de expresión de los genes a estudiar.



Se prepararon reacciones independientes de PCR en Tiempo Real utilizando como templado 0,5 µg de cDNA de *wzy* o *hisG* y el kit de fluorescencia Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) en el equipo Opticon 2 de MJ Research. Las reacciones de PCR se realizaron a distintas temperaturas de alineamiento y de concentraciones de partidores. Se utilizó un gradiente de temperatura que abarcó desde los 54,2 °C hasta 66 °C y concentraciones finales de partidores de 700, 500, 300, y 100 nM. Se analizaron los índices de fluorescencia y las curvas de fusión (melting curves) obtenidas por el equipo Opticon 2 y los productos de cada reacción de amplificación en geles de agarosa al 1,5 %, para determinar las condiciones óptimas de amplificación. Una reacción ideal debe ser aquella que no presenta amplificación inespecífica y que presenta la más alta fluorescencia con la menor concentración de partidores posible. Las condiciones óptimas de amplificación se obtuvieron a una concentración final de partidores de 300 nM y una temperatura de alineamiento de 60 °C.

#### **2.13.4. Ensayos de RT-PCR en Tiempo Real.**

Se utilizaron 5 µg de cDNA por reacción y se incluyeron muestras sin templado y con RNA sin transcriptasa inversa de manera de analizar la posible formación de dímeros de partidores y contaminación con DNA genómico, respectivamente. Las parejas de partidores fueron *rfc-1* y *rfc-2b* para *wzy*, y RT-*hisG*-sf y RT-*hisG2*-sf para *hisG*

Las reacciones se prepararon de la siguiente manera:

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 µL
cDNA específico	0,5 µg
Partidor 1	0,5 µL
Partidor 2	0,5 µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	csp. 25 µL

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes:

Denaturación Inicial	95 °C por 10 min
40 ciclos de	94 °C por 15 s
	60 °C por 15 s
	72 °C por 30 s
Curva de Fusión	72 °C a 90 °C (medición cada 0,2 ciclos)
Incubación	72 °C por 5 min
Incubación	20 °C por 5 min

El análisis de los datos de fluorescencia emitida en cada ciclo además de las Curvas de Fusión, se realizó con el Software Opticon Monitor de MJ Research.

#### **2.13.5. Análisis de los datos de RT-PCR en Tiempo Real mediante el método de la Curva Estándar Relativa.**

Para preparar la curva estándar se extrajo DNA genómico (gDNA) de *S. flexneri* como se describe en 2.8.1.1. Se realizó según el método descrito en el manual de Applied Biosciences ([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042380.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf)). Brevemente, calculando el peso en picogramos de gDNA que contiene una copia del gen, se determinó la concentración necesaria de gDNA que contiene un determinado número de copias del gen de interés. De esta forma se obtuvo una relación entre concentración de gDNA y número de copias de un gen determinado. Con los valores de copias por masa de gDNA, se prepararon diluciones seriadas de una solución stock de gDNA de *S. flexneri* en el cual el gen de interés se encontrara en 300.000, 30.000, 3.000, 300, 30 y 3 copias respectivamente. Se realizaron reacciones de qPCR de la forma descrita en 2.13.4 utilizando 2 µL de cada una de estas diluciones como templado y se analizaron sus respectivos  $C_t$ s (Cycle threshold). Posteriormente, con los valores de  $C_t$ s obtenidos se graficó el logaritmo del número teórico de copias de cada dilución versus sus  $C_t$ s respectivos, desde el cual se interpola el número de copias teórico al que corresponde un determinado  $C_t$  obtenido de una muestra experimental. Del mismo

modo se calculó la eficiencia de las reacciones de qPCR desde las pendientes de las regresiones lineales de las curvas estándar utilizando la siguiente fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

#### **2.14. Análisis estadístico**

Para analizar la significancia estadística de los datos de PCR en Tiempo real se utilizó el test “one way ANOVA” y se comparó las columnas de las cepas mutantes con la silvestre usando el post-test “Tukey”.

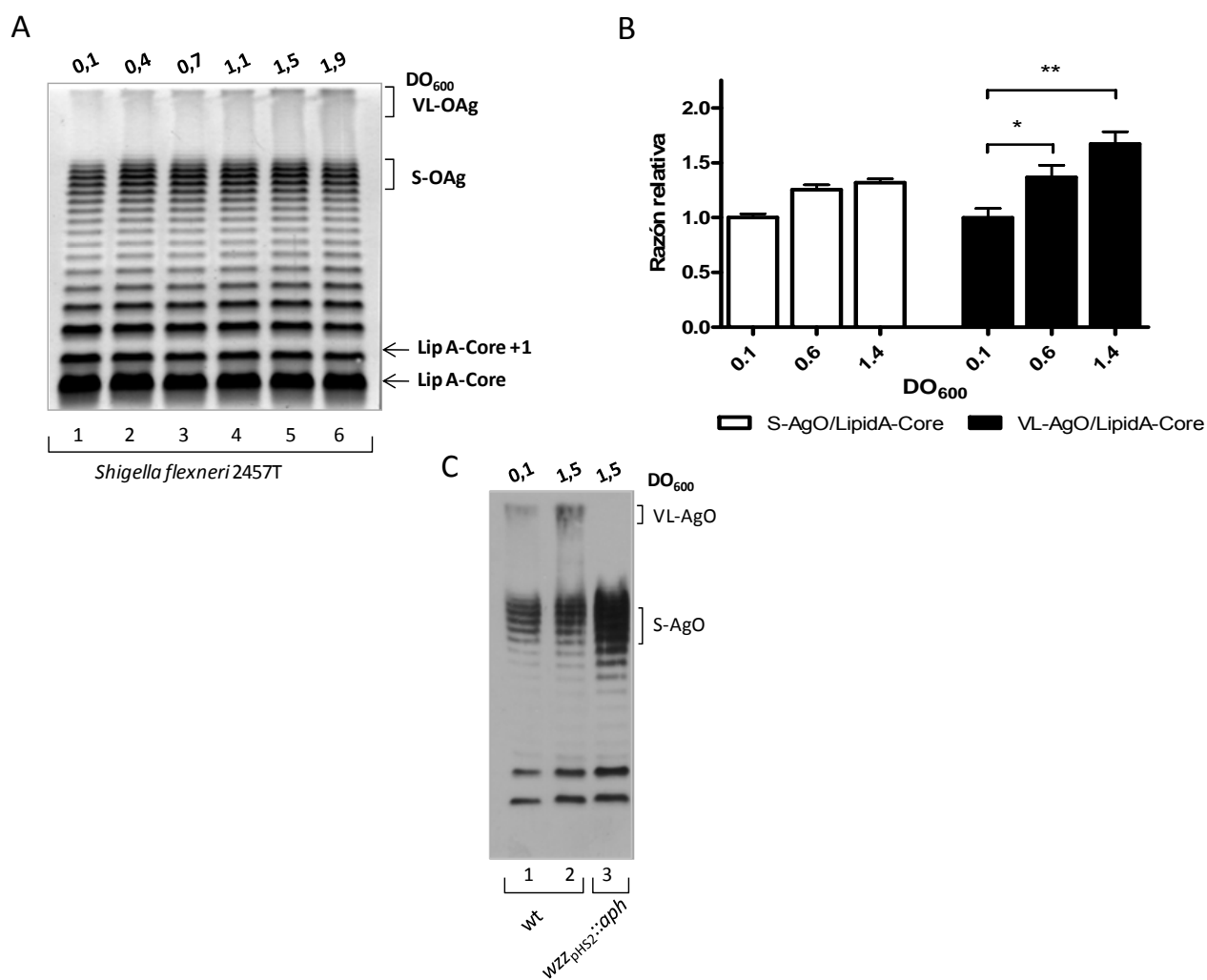
### 3. Resultados

#### 3.1. La producción de VL-AgO aumenta a lo largo del crecimiento de *S. flexneri* 2a.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Bittner *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2001) demostramos que la producción de Antígeno O (AgO) de *Salmonella* Typhi Ty2 aumenta durante el crecimiento bacteriano, y que este cambio se correlaciona con el aumento de la transcripción del factor de elongación RfaH. Para investigar la expresión de AgO en *Shigella flexneri* 2a 2457T, se tomaron muestras de LPS en distintas etapas del crecimiento bacteriano y se analizó el perfil electroforético del LPS en geles de SDS-PAGE y tinción con plata.

El análisis del LPS mostró una regulación diferencial de la producción de LPS durante el crecimiento. Se observó que mientras el AgO de cadena larga (VL-AgO) aumentaba a lo largo del crecimiento, el AgO de cadena corta (S-AgO) permanecía relativamente constante (Fig. 4A). El análisis densitométrico de los distintos carriles mostró un aumento significativo de la razón entre el VL-AgO y el lípido A-Core en las muestras crecidas hasta fase exponencial tardía ( $DO_{600}=0,6$ ) y estacionaria ( $DO_{600}=1,4$ ), comparado con la muestra obtenida en fase exponencial ( $DO_{600}=0,1$ ). En cambio, no se observó diferencias significativas entre la razón del S-AgO y el lípido A-“core” durante el crecimiento (Fig. 4B).

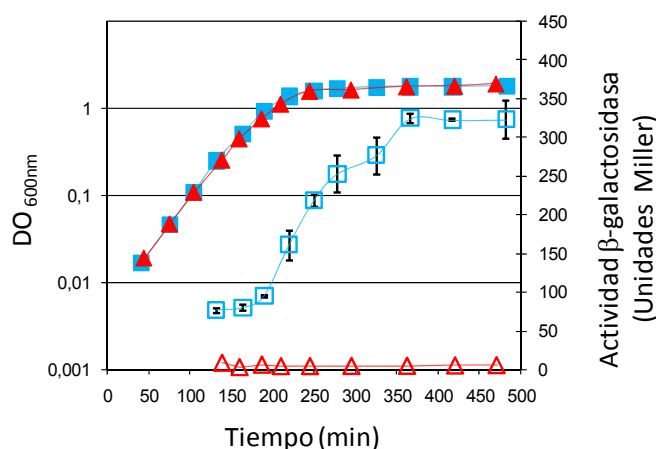
Para confirmar las diferencias de expresión de AgO entre fase exponencial temprana y estacionaria, se realizó una inmunodetección utilizando un suero polivalente contra el AgO de *S. flexneri*. Como se muestra en la figura 4C, se detectó una mayor cantidad de VL-AgO en fase estacionaria (Fig. 4C, carril 2) comparado con fase exponencial temprana (Fig. 4C, carril 1). El LPS de una mutante en el regulador  $Wzz_{pHS2}$ , que no expresa VL-AgO, se cargó como control (Fig. 4C, carril 3).



**Figura 4.** Producción de LPS en *S. flexneri* 2a durante el crecimiento. (A) Se realizó un SDS-PAGE/Tricina cargando en cada carril LPS de muestras obtenidas en las densidades ópticas indicadas (DO<sub>600</sub>) (B) Análisis densitométrico. Las barras representan la razón entre los niveles de AgO (barras blancas) o VL-AgO (barras negras) relativas a la región del lípido A-“core” en fase exponencial temprana (DO<sub>600</sub> 0,1), exponencial media (DO<sub>600</sub> 0,6) y estacionaria (DO<sub>600</sub> 1,4), relativo a la razón en fase exponencial. El análisis densitométrico se realizó en 4 geles independientes. Los asteriscos muestran las diferencias significativas determinadas por el análisis estadístico (one-way ANOVA y post test Tukey, \*P < 0,05 \*\*P < 0,001). (C) Ensayo Western blot de la producción de LPS de la cepa silvestre (2457T, carriles 1 y 2) y la cepa mutante en el gen *wzz*<sub>pH52</sub>. (MSF107, carril 3). Las bacterias fueron crecidas hasta fase exponencial temprana (DO<sub>600</sub> 0,1, carril 1) o fase estacionaria (DO<sub>600</sub> 1,5, carriles 2 y 3). Los corchetes indican ambas modalidades (VL-AgO, S-AgO). Cada carril se cargó con LPS obtenido de aproximadamente 1x10<sup>8</sup> ufc.

### 3.2. La producción de VL-AgO se correlaciona con la expresión de RfaH.

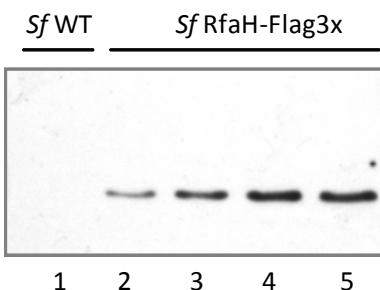
RfaH es un factor de elongación de la transcripción que regula positivamente los genes que codifican las enzimas de la biosíntesis del AgO y del core del LPS en enterobacterias (Bailey *et al.*, 1997). Para examinar si RfaH cumple un rol en la regulación de la síntesis de AgO por fase de crecimiento en *S. flexneri*, se construyó una fusión transcripcional del promotor de *rfaH* al reportero *lacZ* (*rfaH-lacZ*) en el plasmidio de copia única pFZY1 (Koop *et al.*, 1987). El plasmidio resultante, pCB315, se transformó en la cepa *S. flexneri* 2a silvestre (2457T). Además, se construyó el plasmidio pCB261 que contiene una región intragénica del gen *rfaH* clonado en el vector pFZY1, el cual se utilizó como control negativo. La producción de  $\beta$ -galactosidasa de las cepas 2457T/pCB315 y 2457T/pCB261 se midió en varios puntos del crecimiento bacteriano. La figura 5 muestra que la actividad del promotor de *rfaH* aumenta en fase exponencial tardía llegando a un máximo en fase estacionaria. De esta forma, la producción diferencial de VL-AgO se correlaciona con la expresión de *rfaH* durante el crecimiento.



**Figura 5.** Expresión de *rfaH* durante el crecimiento bacteriano. Curva de crecimiento de la cepa 2457T/pCB315 (■) y 2457T/pCB261 (▲). Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión del promotor de *rfaH* (□) y la región intragénica control (Δ) al reportero *lacZ*.

Para determinar si el aumento en la transcripción de *rfaH* se traduce en un aumento en los niveles de la proteína RfaH, se realizó una fusión traduccional en el cromosoma de la cepa silvestre (*S.*

*flexneri* 2457T) del gen que codifica para *rfaH* con la secuencia que codifica para el epítipo comercial FLAG, generando la cepa MSF488. Posteriormente, se obtuvieron proteínas citosólicas de la cepa MSF488 en distintas etapas del crecimiento bacteriano ( $DO_{600}$  0,14; 0,39; 0,79 y 1,39) y se analizó la producción de RfaH por Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG. El resultado mostró un aumento de la proteína RfaH, que se correlaciona con el aumento de la transcripción observado mediante la fusión *rfaH-LacZ* a lo largo del crecimiento bacteriano (Fig. 6).

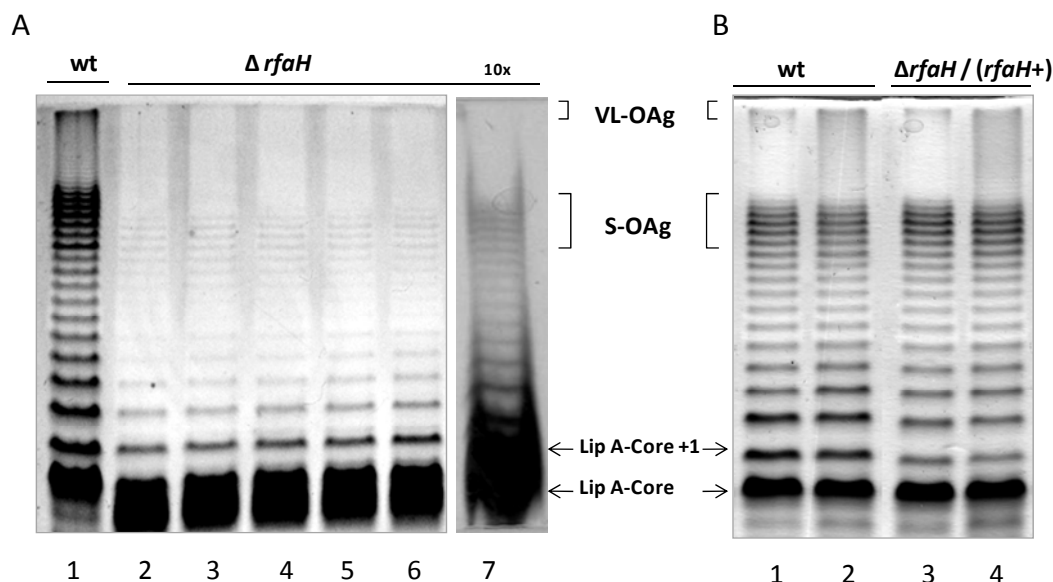


**Figura 6.** Expresión de la fusión RfaH-Flag3x en las distintas fases del crecimiento. Se obtuvieron proteínas citoplasmáticas de *S. flexneri* WT (2457T, carril 1,  $DO_{600}$  1,3) y de *S. flexneri* RfaH-Flag3x (MSF488, carriles 2, 3, 4, 5;  $DO_{600}$  0,14; 0,39; 0,79; 1,39, respectivamente). Se cargaron 10  $\mu$ g de proteínas citosólicas por carril y se realizó el ensayo de Western blot con un anticuerpo anti-FLAG.

### 3.3. RfaH es necesario para la producción y correcta distribución modal del antígeno O en *S. flexneri*.

Para determinar el rol de RfaH en la síntesis de AgO en *S. flexneri*, se construyó una mutante en el gen *rfaH* (MSF487) mediante el método descrito por Datsenko & Wanner (2000) y se monitoreó la producción de LPS mediante SDS-PAGE y tinción con plata. El análisis del perfil de LPS reveló que la producción de AgO en la mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487) fue severamente afectada. Como se muestra en la figura 7, no se detectó VL-AgO durante todo el crecimiento bacteriano. La ausencia de VL-AgO se confirmó cargando un exceso de 10 veces de muestra en un gel (Fig 7A, carril 7). Además, se observó en la cepa MSF487 la producción de una pequeña cantidad de S-AgO, con una mayor migración en el gel. Por otra parte, en esta mutante se observó un aumento de las moléculas de AgO de bajo peso molecular,

lípidos A-“core” sin sustituir y sustituido con una unidad de AgO (lípidos A-core+1), todo lo cual sugiere un defecto en la polimerización. Cuando se transformó la mutante MSF487 con el plasmidio pJC75, que contiene el gen *rfaH* completo, se recuperó el fenotipo de LPS silvestre (Fig. 7B).



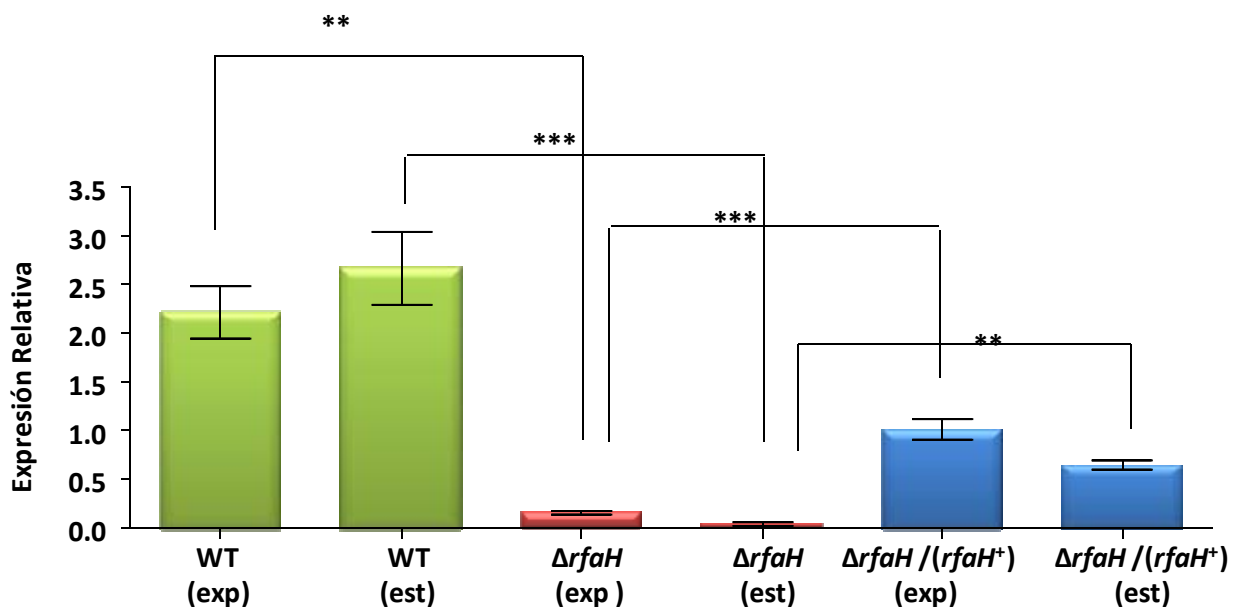
**Figura 7.** Efecto de la delección de *rfaH* sobre la producción de LPS durante el crecimiento en *S. flexneri* 2a. (A) Perfil de LPS de muestras de la cepa MSF487 tomadas a distintas etapas del crecimiento bacteriano (carril 2,  $DO_{600}$  0,3; carril 3,  $DO_{600}$  0,5; carril 4,  $DO_{600}$  0,7; carril 5,  $DO_{600}$  1,1; carril 6,  $DO_{600}$  1,5). Se incluye una muestra de LPS de la cepa MSF487 con un exceso de 10 veces la carga normal (carril 7,  $DO_{600}$  1,5). Además, la figura incluye el fenotipo de la cepa silvestre (wt)(carril 1,  $DO_{600}$  1,5). (B) Complementación de la mutante MSF487 con el plasmidio pJC75. Se tomaron muestras en fase exponencial y estacionaria de la cepa silvestre (carril 1,  $DO_{600}$  0,1; carril 2,  $DO_{600}$  1,2) y la cepa mutante complementada (carril 3,  $DO_{600}$  0,1; carril 4,  $DO_{600}$  1,2). Los corchetes indican ambas modas (VL-AgO, S-AgO). Se indica la región del lípido A-core y lípido A-core +1. El LPS se analizó mediante SDS-PAGE/Tricina y cada carril (excepto carril 7) se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.



### 3.4. Requerimiento de RfaH para la expresión del operón *wba*.

El defecto en la síntesis de AgO de la cepa MSF487 era esperado debido a la presencia de la secuencia conservada de 8 pb llamada *ops* (operon polarity suppressor) en la secuencia líder del operon *wba* (Bailey *et al.*, 1997). RfaH reconoce e interacciona con la secuencia *ops* y la RNA polimerasa, generando un complejo de elongación resistente a la terminación en operones largos (Artsimovitch & Landick, 2002; Bailey *et al.*, 1997; Bittner *et al.*, 2002), por lo tanto, la ausencia de RfaH afecta particularmente la transcripción de los genes distales. En *S. flexneri*, el gen *wzy*, que codifica para la polimerasa del AgO, es el último gen del operón *wba* (Morona *et al.*, 1994) y su transcripción podría verse disminuida por la ausencia de RfaH produciéndose un defecto en la polimerización. Para investigar esta hipótesis, se examinó mediante qRT-PCR los niveles del transcrito de *wzy* en la cepa silvestre y en la mutante  $\Delta rfaH$  en fases exponencial y estacionaria de crecimiento. El resultado mostró una drástica reducción en la expresión de *wzy* en la mutante  $\Delta rfaH$  en ambas fases comparada con la cepa silvestre (Fig. 8). Cuando la cepa MSF487 se transformó con el plasmidio pJC75, se observó un aumento significativo en la expresión de *wzy* (alrededor del 40 % de la cepa silvestre), confirmando el requerimiento del antiterminador RfaH para la completa expresión del operón *wba*. Un experimento preliminar, mostró que la complementación de la cepa silvestre con el plasmidio pJC75 aumenta significativamente el nivel de transcrito de *wzy* por sobre la expresión de la cepa silvestre (resultados no mostrados). Este resultado sugiere que la incompleta complementación de la mutante MSF487 podría deberse a un efecto cis producto de la ausencia del gen *rfaH* en su propio contexto genético. Estos resultados deberán ser corroborados en futuros estudios.

Con respecto a la expresión de *wzy* en distintas fases de crecimiento, al analizar el nivel de transcrito en la cepa silvestre se observó un aumento de alrededor de 20 % en fase estacionaria, en comparación a fase exponencial. Esta regulación fase-dependiente no se observó, sin embargo, en la cepa complementada. Esto apoya la idea que el nivel de RfaH es importante para ejercer su efecto regulatorio y que su sobreexpresión afecta la regulación fase-dependiente de la transcripción del operón *wba*.



**Figura 8.** Efecto del gen *rfaH* en la expresión de *wzy* de *S. flexneri* 2a. A) Las barras representan el nivel de transcrito de *wzy* determinado por qRT-PCR en fase exponencial (exp) y estacionaria (est). La expresión relativa de *wzy* se analizó por el método de curva estándar relativa y se normalizó a los niveles de *hisG* (ver materiales y métodos). Se estudiaron las cepas, *S. flexneri* 2a WT ( 2457T, barras verdes), *S. flexneri* 2a  $\Delta rfaH$  (MSF487, barras rojas) y *S. flexneri* 2a  $\Delta rfaH/rfaH^+$  (MSF487/pJC75, barras azules). Se muestran los promedios  $\pm$  ES de al menos 3 determinaciones. El estudio estadístico se realizó utilizando el test de Student no pareado (\*\* =  $p < 0.0022$ , \*\*\* =  $p < 0.0009$ ).

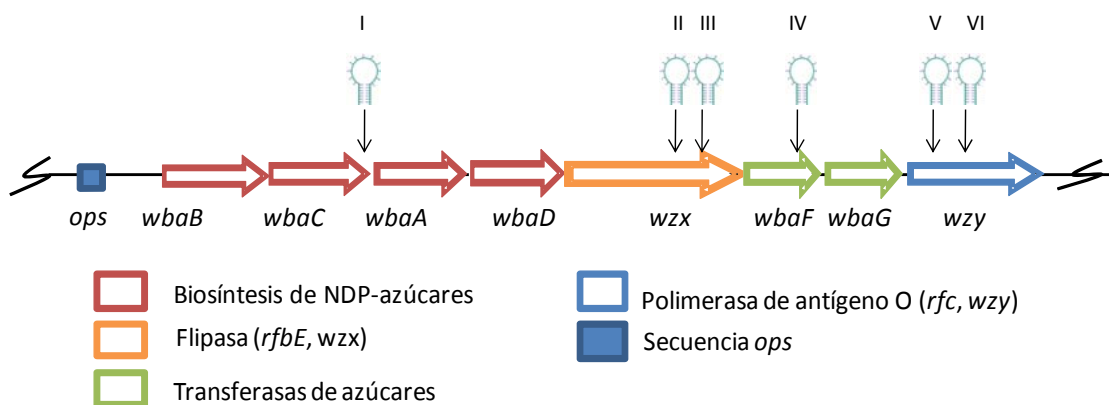
Los resultados anteriores mostraron que RfaH es necesario para la transcripción de *wzy*.

Dado que RfaH es un antiterminador transcripcional, es esperable encontrar sitios de término dentro del operón *wba*. Entonces para analizar más a fondo el requerimiento de RfaH, se estudiaron los posibles sitios que afectarían la transcripción completa del operón *wba*.

La terminación de la transcripción en procariontes se puede producir por factores extrínsecos (como el factor Rho) o por señales intrínsecas en la secuencia del transcrito. Estas últimas se caracterizan por la formación de estructuras de horquilla en la secuencia del transcrito. Estas horquillas poseen un tallo rico en G-C (Guanina-Citosina) y una secuencia poli-U (Uracilo) de alrededor de 3 a 8 nucleótidos, que generan pausas en la transcripción. Estas pausas pueden llevar a un desacoplamiento de la maquinaria transcripcional y posterior detención de la transcripción. Sin embargo, estas pausas pueden ser superadas por la acción antiterminadora de RfaH (Artsimovitch & Landick, 2002; Ciampi, 2006).

Para analizar el requerimiento de RfaH para la expresión del operón *wba* se analizó la presencia de posibles secuencias que terminarían prematuramente la transcripción. Esto se realizó utilizando el programa TransTermHP “Transcription Terminator Predictions” (disponible en <http://transterm.cbcb.umd.edu>) (Kingsford *et al.*, 2007). Este programa analiza la posible formación de estructuras de horquilla y la presencia de secuencias poli U, asignando un índice de confianza (IC) de 0 a 100, que representa la probabilidad de que la estructura encontrada sea un terminador. Tras analizar el operon *wba*, se encontraron 71 posibles estructuras terminadoras, de las cuales se seleccionaron aquellas que tuvieran un IC > 60. Finalmente, se obtuvieron 6 regiones que se indican en la figura 9.

Como se observa en la figura 9, cinco de las seis regiones seleccionadas se encuentran en la región distal del operón y afectarían mayormente la transcripción de la flipasa (*wzx*), dos glicosiltransferasas (*wbaF* y *wbaG*) y la polimerasa (*wzy*). De estas 5 regiones, la región VI, que se encuentra dentro del gen *wzy*, posee un IC igual a 100, lo que sugiere una alta probabilidad de que efectivamente sea un sitio de terminación y produzca una terminación prematura de la transcripción en ausencia de RfaH. Estos resultados concuerdan con el fenotipo de la mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487), la cual presenta un LPS con una disminuida polimerización del AgO (ver Fig. 7), y un menor nivel de transcrito de *wzy* (ver Fig. 8).

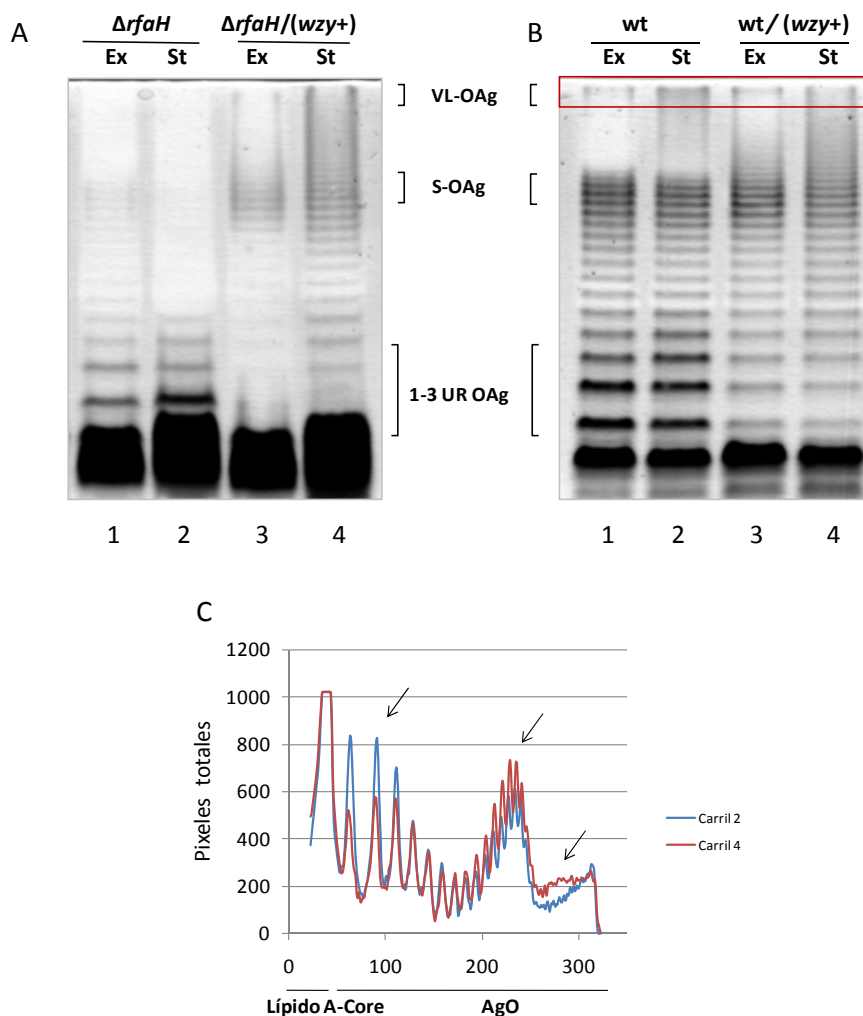


Region	Secuencia	IC
I	5'-taacaaattattgcatctcgcctcatgatgctagagcgagatgaattaaaggaat-3'	61
II	5'-gtttctaactgtttg <u>ccggtgataatcataggctt</u> gttatattcaggg-3'	63
III	5'-ctgctttgattcattgtgctgaattggtccttatttagccctttgtattttatgg-3'	71
IV	5'-gttattatcgagtaagaaatgcatttcttttgcttagaaaa-3'	62
V	5'-atttacactaagatata <u>actttaaagt</u> attttcatgtgagatt-3'	67
VI	5'-gcgagttctttttcgtccgatggggctttttttccaatc-3'	100

**Figura 9.** Presencia de posibles terminadores intrínsecos de la transcripción en el operón *wba*. (A) Se indican con números romanos la ubicación de 6 regiones terminadoras determinadas bioinformáticamente en el operon *wba*, que poseen un índice de confianza mayor a 60 (IC>60). Además se señalan los genes del operón y la ubicación de la secuencia *ops*. (B) Secuencia nucleotídica de las regiones terminadoras y su índice de confianza. La secuencia subrayada corresponde a la secuencia que forma la estructura del tallo.

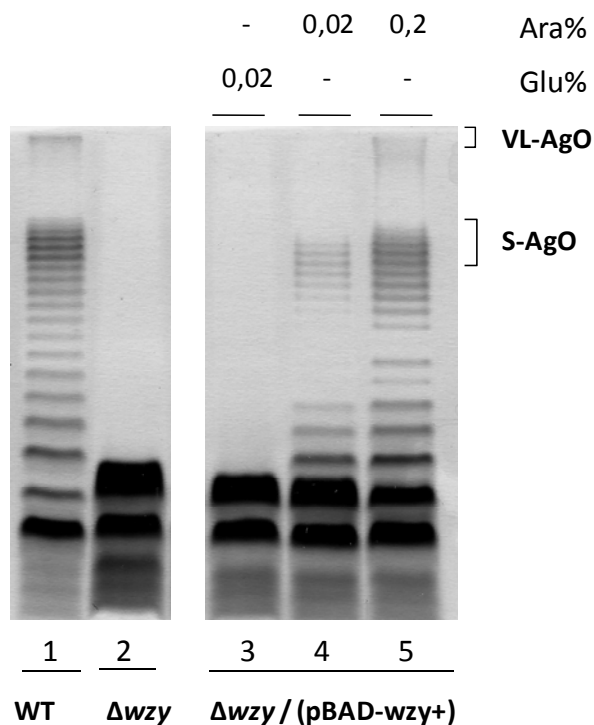
### 3.5. La cantidad de Wzy determina la distribución de los largos de cadena del antígeno O.

Los resultados anteriores indican que la actividad de RfaH es esencial para la expresión de *wzy* y en consecuencia la polimerización normal del AgO en *S. flexneri* 2a. Para investigar en mayor profundidad este fenómeno, se transformó la cepa mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487) con el plasmidio pJC114, que contiene el gen *wzy* clonado en pGEMT-Easy. El análisis de los perfiles de LPS mostró que esta cepa recupera la capacidad de producir VL-AgO en ambas fases del crecimiento bacteriano (Fig. 10A, carriles 3 y 4). Además, se observó una disminución de la cantidad de AgO de bajo peso molecular (1-3 UR, Fig. 10A, carriles 3 and 4). En consecuencia, el aumento de la expresión de *wzy* complementa el defecto en el fenotipo del LPS de la cepa mutante  $\Delta rfaH$ , detectándose VL-AgO. Sin embargo, al observar con detención el perfil del LPS, la cepa MSF487/pJC114 muestra una distribución modal alterada, distinta a la observada en la cepa silvestre, ya que produjo un mayor número de moléculas de AgO de alto peso molecular en comparación con las de bajo peso molecular (Fig. 10A, carriles 3 y 4). Esto sugiere que el nivel celular de Wzy podría influenciar no sólo la polimerización del AgO, sino también la distribución del largo de las cadenas de AgO. Para probar esta hipótesis, se transformó la cepa silvestre (2457T) con el plasmidio pJC114 y se analizó el perfil de LPS durante el crecimiento. Como se muestra en la Figura 10B, el efecto de la sobreexpresión de *wzy* en la cepa silvestre produce un AgO con menor número de moléculas de bajo peso molecular con 1-3 unidades repetidas (1-3 UR). También se observa una disminución de la moda S-AgO que contrasta con el aumento de la producción de AgO de alto peso molecular.



**Figura 10.** Efecto de la sobreexpresión de la polimerasa en la mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487) (A) y la cepa silvestre (2457T) (B). Se realizó un SDS-PAGE/Tricina y se analizó el efecto de introducir el plasmidio pJC114 ( $wzy^+$ ) sobre el perfil del LPS en la mutante MSF487 (A, carriles 3 y 4) y en la cepa silvestre (B, carriles 3 y 4) en dos etapas del crecimiento bacteriano y su comparación con el LPS de la mutante MSF487 (A, carriles 1 y 2) y la cepa silvestre (B, carriles 1 y 2). Cada carril se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc. Se destaca en un rectángulo rojo la zona de desregulación de la moda VL-AgO en la cepa silvestre que sobreexpresa  $wzy$ . (C) Densitometría de los carriles 2 y 4 de la figura 10B. Se destaca con flechas la redistribución del antígeno O en comparación con la cepa silvestre en fase estacionaria. La intensidad de píxeles totales en cada carril fue comparable. Ex=exponencial, St=estacionaria, UR=unidades repetidas

Para analizar con más precisión el efecto del nivel celular de Wzy sobre la síntesis de AgO, se construyó un plasmidio inducible por arabinosa que tiene clonado el gen que codifica para la polimerasa *wzy* (pJC115). El plasmidio se transformó en la mutante  $\Delta wzy$  (MSF114) y se realizó una inducción controlada del gen *wzy* (Fig. 11). El resultado muestra que, a una baja inducción de *wzy* se produce S-AgO (Fig. 11, carril 4), en tanto que al aumentar la expresión de *wzy*, se observó además síntesis de VL-AgO (Fig. 11, carril 5).



**Figura 11.** Efecto de la expresión controlada de *wzy* sobre la síntesis de AgO en una mutante  $\Delta wzy$  (MSF114). Se muestran la cepa silvestre (2457T, carril 1); cepa mutante  $\Delta wzy$  (MSF114, carril 2); cepa mutante  $\Delta wzy/pBAD24-wzy^+$  (MSF114/pJC115, carriles 3 al 5) con distintas condiciones de inducción o represión especificadas en la parte superior de cada carril. Glucosa (Glu), Arabinosa (Ara), los corchetes indican ambas modas. El LPS se analizó mediante SDS-PAGE/Tricina y cada carril se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.

Estos resultados indican que los niveles de Wzy son importantes no sólo para la polimerización del AgO sino también para la producción de AgO con una distribución modal correcta. Por lo tanto, sugieren que debería existir un nivel de regulación fina del nivel de Wzy, para determinar un AgO con niveles de polimerización y distribución modal silvestres en *S. flexneri*.

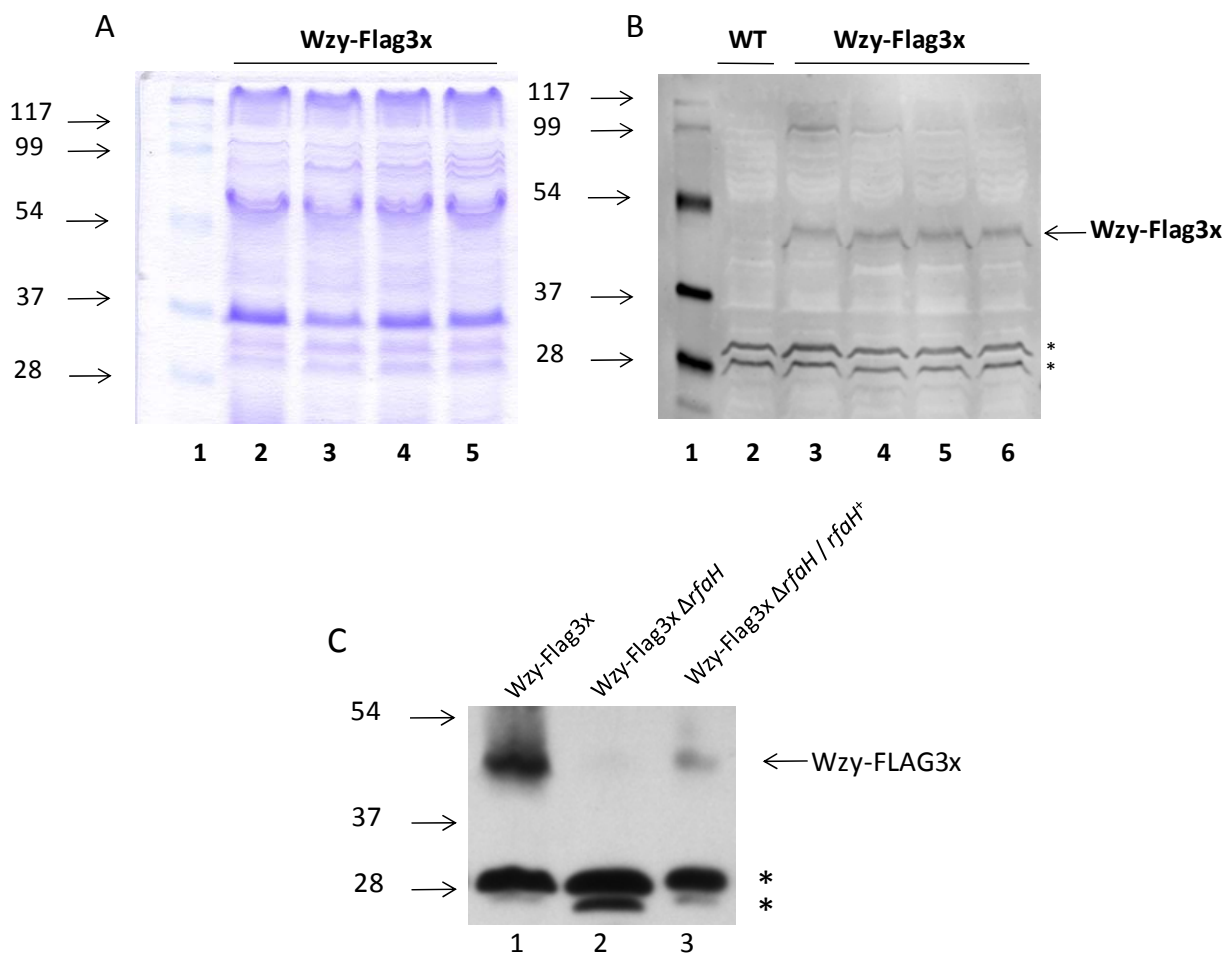
Para estudiar la producción de Wzy a lo largo del crecimiento, se construyó una fusión cromosomal del gen *wzy* con la secuencia que codifica para el epítoto comercial FLAG3x (MSF117). El ensayo se realizó obteniendo muestras de proteínas de membrana totales de la cepa *S. flexneri wzy-Flag3x* (MSF117), en distintas etapas del crecimiento bacteriano.

Anteriormente, se había tratado de detectar la polimerasa Wzy sin éxito (Collins & Hackett, 1991; Lukomski *et al.*, 1996; Morona *et al.*, 1994). Una posible explicación para esto se basa en que el gen *wzy* tiene un disminuido inicio de la transcripción, ya que tras analizar la secuencia, no se ha encontrado un sitio de unión a ribosoma. Además, existen codones inusuales en los primeros 25 aminoácidos de la proteína, produciendo la detención del ribosoma, lo cual previene posteriores inicios de la traducción (Chen & Inouye, 1994; Daniels & Morona, 1999). Por lo tanto la identificación de Wzy-Flag3x requirió de una optimización del ensayo Western blot.

Recientemente, Vines *et al.* (2005) fueron capaces de detectar la polimerasa fusionada al epítoto FLAG3x en *E. coli* W3110 mediante Western blot y un método de purificación que involucra una lisis mediante prensa French, un gradiente de sacarosa para obtener proteínas de membrana y un segundo gradiente para obtener la fracción de membrana interna. Posteriormente el Western blot se reveló usando el sistema de detección infrarojo Odyssey Infrared Imager (Li-Cor Biosciences) el cual aumenta considerablemente la sensibilidad del método.

Entonces, para detectar la proteína Wzy-Flag3x de *S. flexneri*, se utilizó el sistema de detección infrarojo como se indica en materiales y métodos. La Figura 12 muestra por primera vez la detección de la proteína Wzy de *S. flexneri* expresada sólo en su copia cromosomal.





**Figura 12.** Análisis de la polimerasa Wzy mediante Western blot. (A) Se realizó un SDS-PAGE con proteínas de membrana extraídas de la cepa *S. flexneri* Wzy-Flag3x (MSF117) en distintas etapas del crecimiento bacteriano ( $DO_{600}$  0,16; 0,45; 0,75; 1,25; carriles 2, 3, 4, 5, respectivamente), carril 1: estándar de peso molecular. (B) Ensayo Western blot para detectar la proteína Wzy-Flag3x. Se muestra la cepa *S. flexneri* silvestre (2457T,  $DO_{600}$  1,2, carril 2); y *S. flexneri* wzy-Flag3x (MSF117,  $DO_{600}$  0,16; 0,45; 0,75; 1,25; carriles 3, 4, 5, 6 respectivamente). Carril 1: estándar de peso molecular. (C) Detección de Wzy mediante Western blot en la cepa wzy-Flag3x (MSF117, carril 1), wzy-Flag3x  $\Delta rfaH::cat$  (MSF604, carril 2) y la complementación de la mutante wzy-FLAG3x  $\Delta rfaH::cat$  con el gen *rfaH* (MSF604/pJC75, carril 3) en muestras de proteína de membrana tomadas en fase estacionaria. Además se señala la detección de bandas inespecíficas con un asterisco (\*). Se cargaron 40  $\mu$ g de proteínas de membrana por carril.

El resultado no muestra una diferencia clara de expresión de la proteína durante el crecimiento bacteriano, a pesar del aumento observado en la transcripción de *wzy* según los resultados de qRT-PCR. Este resultado no descarta que exista un aumento de Wzy a lo largo del crecimiento, ya que, debido a que la cantidad de Wzy es muy baja, el aumento también podría ser sutil, lo que dificulta detectar la diferencia en un Western blot. Para estudiar el efecto de RfaH sobre la síntesis de Wzy, se construyó una mutante en el gen *rfaH* sobre la cepa MSF117 (*S. flexneri wzy-Flag3x*). El resultado mostró que la ausencia de *rfaH* produce una disminución drástica de la síntesis de Wzy (Fig. 12C, carril 2). La complementación de la mutante con el plasmidio pJC75 (*rfaH*<sup>+</sup>) restaura significativamente la síntesis de Wzy (Fig. 12C, carril 3). Además, se observa en los carriles 3 y 4 (Fig. 12B) bandas de alto peso molecular que podrían corresponder a un dímero, esto se analiza más a fondo en los ensayos de entrecruzamiento (ver más adelante).

A pesar de no detectar un aumento de la proteína, sí se observó una mayor polimerización de AgO en fase estacionaria (ver Fig. 4C, carril 2), probablemente por un aumento en el nivel de la polimerasa debido a RfaH. Posiblemente, aparte de la influencia sobre la transcripción de *wzy* dada por RfaH, otros factores estarían participando en la regulación de la expresión de la polimerasa. Uno de estos factores podría ser la presencia de codones infrecuentes.

### **3.6. Presencia de codones infrecuentes en el gen *wzy*.**

Se ha sugerido que la presencia de codones infrecuentes en el mRNA contribuye a la regulación de la síntesis o la actividad de la proteína (Chen & Inouye, 1994; Marin, 2008; Phoenix & Korotkov, 1997; Purvis *et al.*, 1987). El uso diferencial de codones provoca que una secuencia de RNA se traduzca a distinta velocidad (Pedersen, 1984) y los codones con baja concentración de tRNA (codones infrecuentes) producen una pausa en la traducción hasta que se disponga del tRNA correcto.

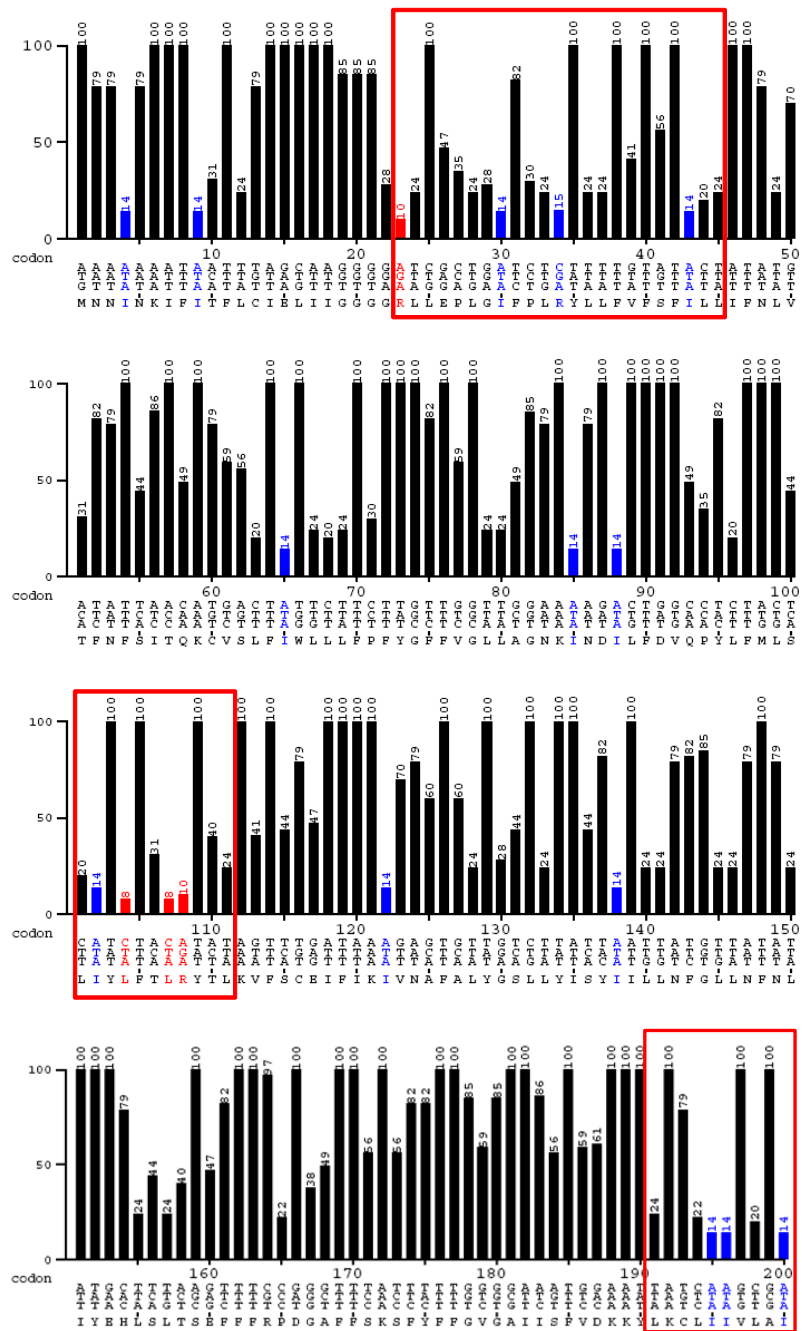
Para definir la presencia y distribución de codones infrecuentes en el transcrito de *wzy* se utilizó la información descrita por Nakamura *et al.* (2000) que muestra la frecuencia de todos los codones en los

marcos de lectura presentes en el genoma de *Shigella flexneri* 2457T (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=198215>). Se analizó la presencia de codones infrecuentes utilizando el servicio disponible en internet Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcu.schoedl.de/>). Se consideraron los codones que tuvieran un índice CAI (codon adaptation index) menor o igual a 15 %. El índice CAI, o adaptabilidad relativa, representa el porcentaje de uso de un codón para un aminoácido determinado, relativo a la frecuencia del codón más utilizado para el mismo aminoácido (100 % representa al codón más frecuente para un determinado aminoácido) (Sharp & Li, 1987). En *wzy* de un total de 382 codones se encontraron 37 codones infrecuentes con las características antes señaladas (Tabla 9 y Fig. 13).

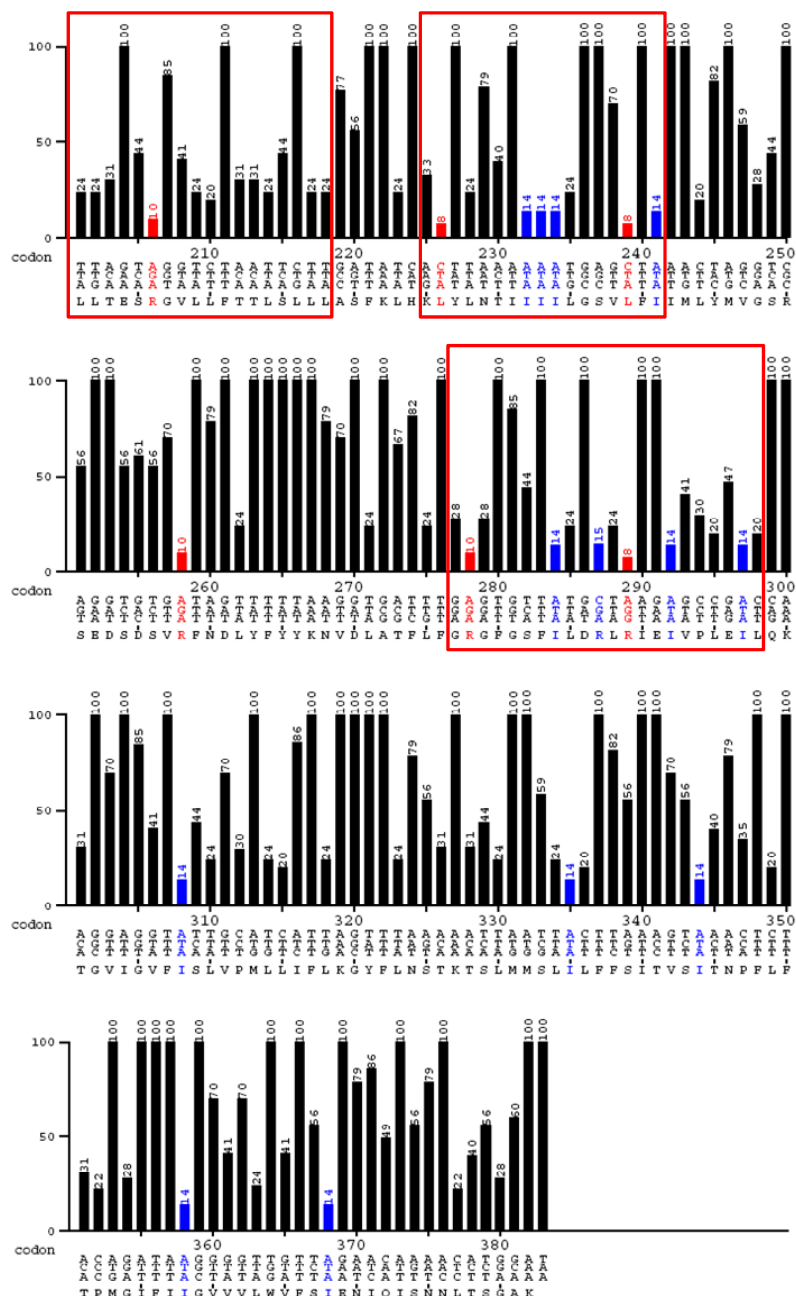
**Tabla 9.** Codones infrecuentes del transcrito de *wzy* de *S. flexneri* 2a 2457T.

Codon	aa	Nº de codones	CAI
AGG	ARG (R)	1	8
AGA	ARG (R)	5	7
CGA	ARG (R)	2	15
CUA	LEU (L)	4	7
AUA	ILE (I)	25	15

Se puede observar la presencia de codones infrecuentes a lo largo de toda la proteína. Existen regiones en que estos predominan: se puede ver una acumulación de codones infrecuentes en ciertas regiones del transcrito que poseen más de un 70 % de codones con índice CAI menor a 50 (regiones entre los codones 23-45; 101-111; 191-218; 277-298), o tienen al menos 3 codones infrecuentes seguidos (regiones entre los codones 225-241). Estas acumulaciones podrían estar contribuyendo a regular la expresión o función de *Wzy* (Chen & Inouye, 1994; Purvis *et al.*, 1987).

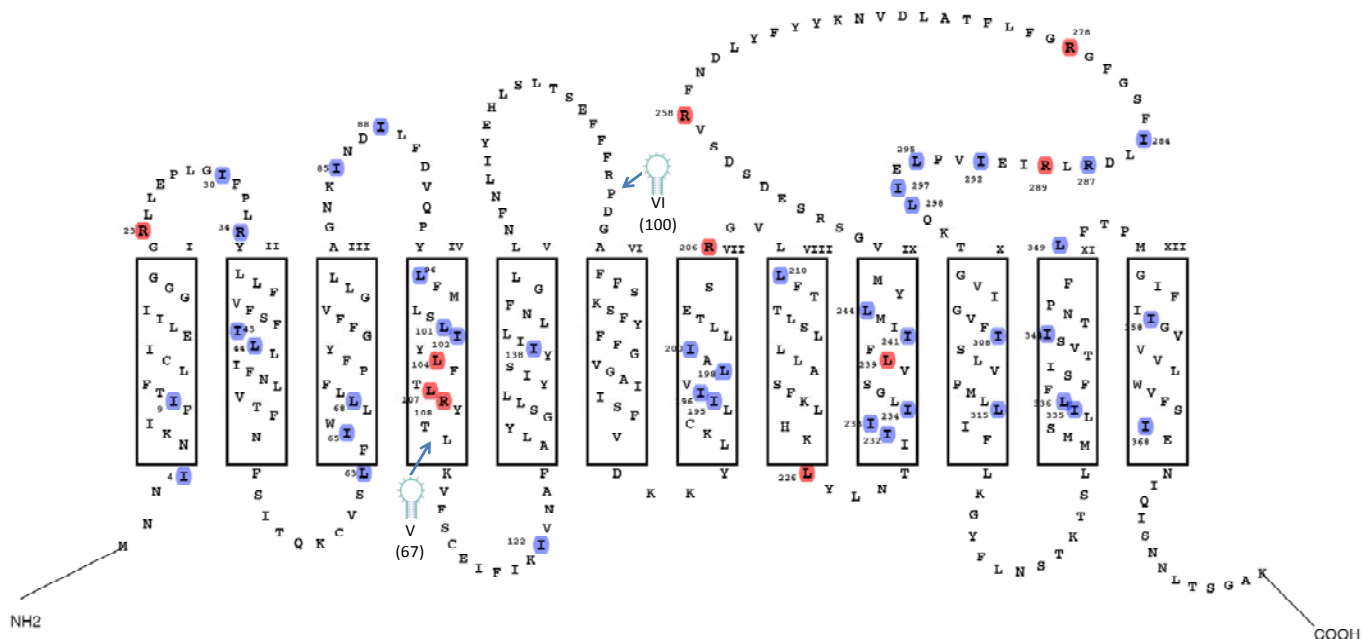


Continúa.



**Figura 13.** Índice de adaptabilidad relativa (CAI) de los codones presentes en el transcrito de wzy. Se destacan los codones con CAI entre 10 % y 15 % (Barras azules) o menores a 10 % (Barras rojas). Los datos se obtuvieron de la herramienta disponible en internet, Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcu.schoedl.de/>). Se enmarcan con rojo las regiones que poseen más de un 70 % de codones con índice CAI menor a 50.

Basándose en la predicción topológica de Wzy determinada por Daniels *et al.* (1998) mediante estudios bioinformáticos y ensayos experimentales, en la Figura 14 se destaca la ubicación de los aminoácidos de la proteína codificados en codones infrecuentes.



**Figura 14.** Ubicación de aminoácidos codificados por codones infrecuentes en Wzy, basado en la topología determinada por Daniels *et al.* (1998). Se destacan los aminoácidos resultantes de codones infrecuentes durante la traducción del transcrito de *wzy*. En rojo y en azul los aminoácidos que provienen de codones con índice CAI 0-10 % o 11-15 % respectivamente (ver texto). Además se indica la ubicación aproximada de las secuencias terminadoras y sus respectivos índices de confianza descritos en la figura 9.

La proteína presenta 12 dominios transmembrana, con un gran segmento periplásmico de 54 aminoácidos (aa) entre los dominios IX y X. En la figura, se señalan con rojo, los aa producto de un codón con índice CAI menor a 10 % y con azul los aa producto de codones con índice CAI entre 10 % y 15 %. La

mayoría de los dominios transmembranas (TM I, II, III, IV, V, VII, IX, X, XI, XII) y algunos loops (Lp) (entre TM I-II, TM III-IV, TM IV-V, TM VII-VIII, TM VIII-IX, TM IX-X) presentan aminoácidos provenientes de codones infrecuentes. Las regiones que anteriormente se destacaron por tener, ya sea más de un 70 % de codones con índice CAI menor a 50 o al menos 3 codones infrecuentes seguidos, coinciden con las regiones Lp I-TM II (23-45), TM IV (101-111), TM VII – Lp 7 (191-218), Lp 8 – TM IX (225-241), Lp 9 (277-298).

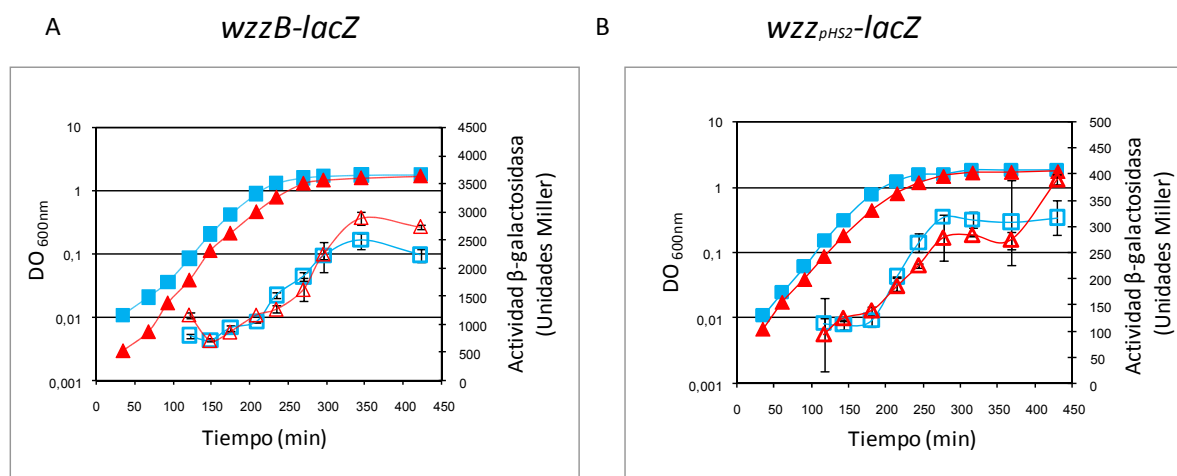
De acuerdo a los estudios realizados por Chen *et al.* (1994) en *E. coli*, la presencia de codones infrecuentes en la secuencia que codifica para los primeros 25 aminoácidos (especialmente AGA), es de gran importancia para la traducción de la proteína, ya que produce una detención en el ribosoma y por su proximidad al inicio de la traducción, impide el reclutamiento de más ribosomas para continuar con el inicio de la traducción. Esta idea se podría aplicar a Wzy, ya que presenta 3 codones infrecuentes en los primeros 25 aminoácidos (ATA<sub>4</sub>, ATA<sub>9</sub>, AGA<sub>23</sub>).

Por otra parte, otros autores postulan que la presencia de codones infrecuentes a lo largo de la proteína, ayudarían al plegamiento de ésta. Esto se debe a que las pausas producidas por estos codones, permitirían que los dominios nacientes se plieguen favorablemente, ya que la proteína parcialmente sintetizada tendría menor cantidad de potenciales interacciones (Crombie *et al.*, 1992; Phoenix & Korotkov, 1997; Purvis *et al.*, 1987). Debido al gran número de dominios TM que posee Wzy, es posible que requiera un mecanismo de plegamiento controlado, para quedar en un estado funcional. Además, si se cree que Wzy podría estar interactuando con otras proteínas de la síntesis de AgO, estas pausas podrían otorgar el tiempo necesario para permitir la formación del complejo proteico.

### **3.7. El control de la expresión de los reguladores del largo de cadena es independiente de RfaH.**

La cepa mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487), además de una menor polimerización, presenta una disminución de la moda S-AgO y ausencia de VL-AgO. Para determinar si esto se debe a un defecto en la expresión de los reguladores del largo de cadena, se construyeron las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>* al reportero *lacZ* en el plasmidio de bajo número de copias

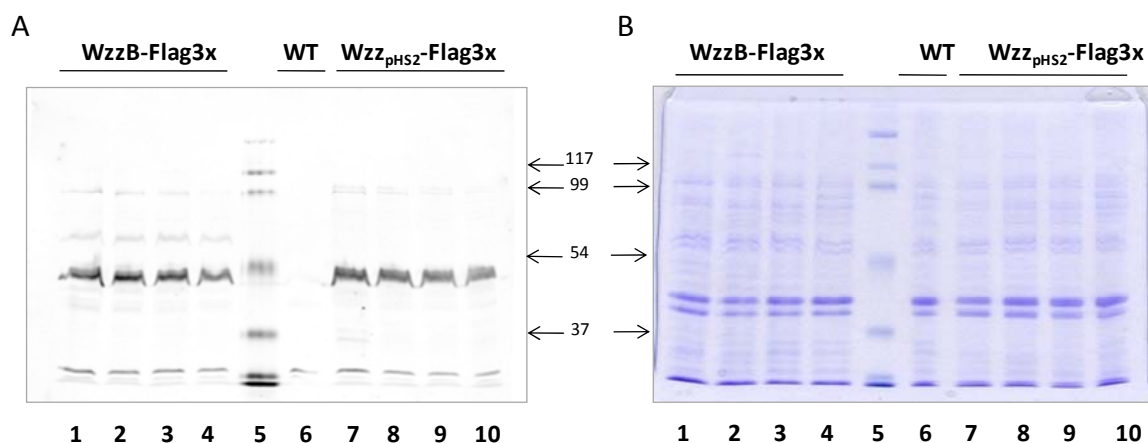
pFZY1, generando los plasmidios pCB326 y pCB280, respectivamente. Estos se introdujeron en la cepa silvestre y en la cepa mutante  $\Delta rfaH$ , para determinar si la expresión de los reguladores era dependiente de RfaH. Los ensayos  $\beta$ -galactosidasa mostraron una regulación fase-dependiente de la transcripción de ambos genes ( $wzzB$  y  $wzz_{pHS2}$ ) con un aumento en fase exponencial tardía y estacionaria (Fig. 15), tanto en la cepa silvestre (2457T), como en la mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487), indicando que la expresión de los reguladores es independiente de RfaH.



**Figura 15.** Efecto de RfaH sobre la expresión de los reguladores del largo de cadena durante el crecimiento. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones pCB326 (A) y pCB280 (B) en la cepa silvestre (2457T) (□) y mutante (MSF487) (△). Se muestran además las curvas de crecimiento de la cepa silvestre (■) y la mutante  $\Delta rfaH$  (▲).

Para estudiar la producción de los reguladores del largo de cadena en la cepa silvestre, se construyeron fusiones cromosomales del gen  $wzzB$  y  $wzz_{pHS2}$  con la secuencia que codifica para el epítipo comercial FLAG, generando las cepas MSF103 ( $WzzB$ -Flag3x) y MSF109 ( $Wzz_{pHS2}$ -Flag3x). Se obtuvieron muestras durante el crecimiento bacteriano y se analizaron mediante Western blot (Fig. 16).





**Figura 16.** Análisis de la producción de WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub> durante el crecimiento bacteriano. Ensayo Western blot (A) y gel SDS-PAGE (B) de muestras proteicas obtenidas de la cepa *S. flexneri* WzzB-Flag3x (MSF103, carriles 1-4), y *S. flexneri* Wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x (MSF109, carriles 7-10). Se obtuvieron muestras a DO<sub>600</sub> 0,1 (carriles 1 y 7); 0,35 (carriles 2 y 8); 0,65 (carriles 3 y 9); 1,2 (carriles 4 y 10). Se muestra el estándar de peso molecular (carril 5) y la cepa silvestre como control (carril 6). Se cargaron 10 µg de proteína de membrana por carril.

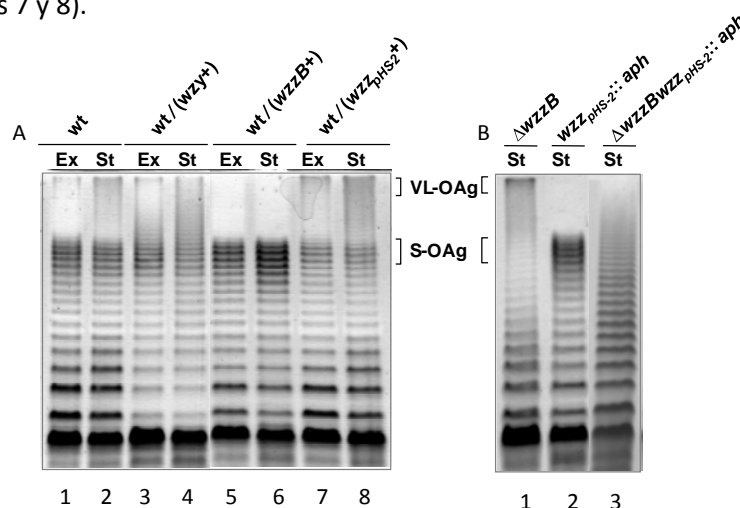
El resultado muestra que, a pesar de existir un aumento en la actividad del promotor de ambos genes, *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>*, (detectado mediante fusiones transcripcionales), no existe un cambio significativo en el nivel de las proteínas a lo largo del crecimiento bacteriano.

### 3.8. La cantidad relativa de la polimerasa y los reguladores del largo de cadena es importante para determinar un LPS silvestre.

Trabajos anteriores han demostrado la importancia de un balance específico entre Wzy, WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub>. Daniels *et al.* (1998) observaron que la complementación de una mutante en la polimerasa wzy con el gen wzy clonado en un plasmidio de alto número de copias, producía un LPS con un aumento en la cadena de AgO de alto peso molecular. Como se vio anteriormente (ver Fig. 10) la sobreexpresión de la polimerasa Wzy, produce un LPS con menos unidades de AgO de bajo peso molecular, menor producción

de S-AgO y una mayor polimerización intermedia entre las dos modas indicando un descontrol de la regulación del largo de cadena.

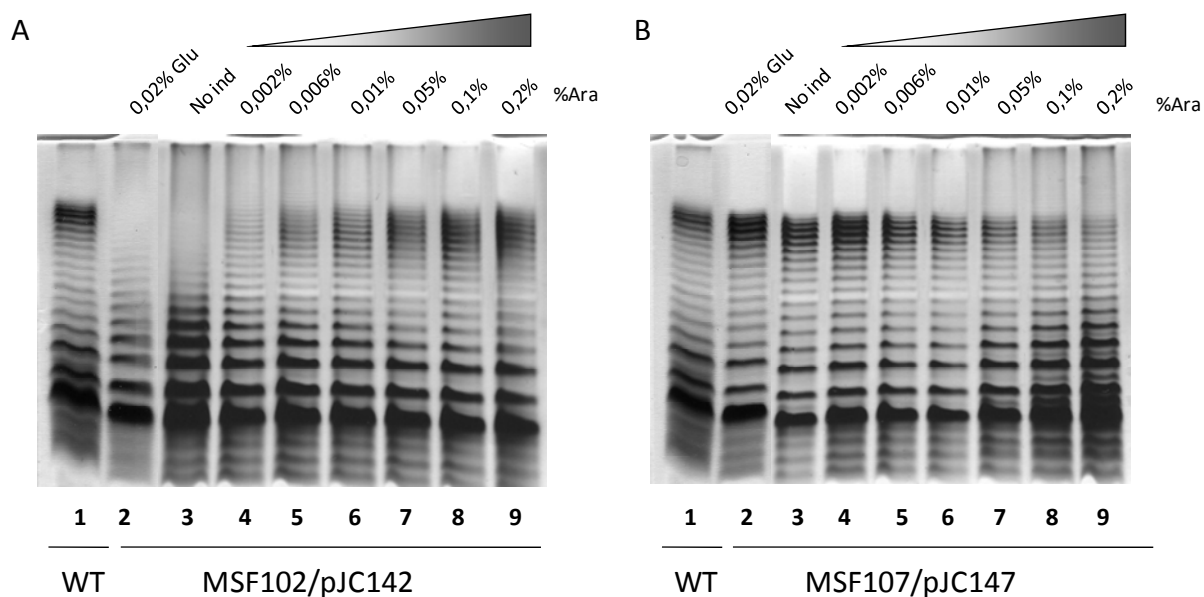
Para investigar la influencia de un aumento en la proporción de los genes que regulan el largo de cadena del AgO, se clonaron los genes que codifican para los reguladores WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub> con sus respectivos promotores en el plasmidio multicopia pGEM-T Easy. Los plasmidios resultantes, pJC139 (wzzB<sup>+</sup>) y pJC144 (wzz<sub>pHS2</sub><sup>+</sup>) se transformaron en la cepa silvestre (2457T) y se analizó el perfil de LPS. Como se observa en la Figura 17, la cepa 2457T/pJC139 (carriles 5 y 6) produjo un mayor número de moléculas de S-AgO que la cepa silvestre y no se observa VL-AgO. En esta cepa, la expresión de S-AgO fue regulada por fase de crecimiento, aumentando en fase estacionaria. Por otra parte, la sobreexpresión del regulador Wzz<sub>pHS2</sub> en la cepa 2457T/pJC144 (carriles 7 y 8), produjo un aumento en la producción de VL-AgO en comparación a la cepa silvestre, particularmente en fase estacionaria. En contraste, en esta cepa se observó una pequeña producción de S-AgO en fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Figura 17, carriles 7 y 8).



**Figura 17.** (A) Efecto de la sobreexpresión de los reguladores del largo de cadena o la polimerasa del AgO sobre el perfil de LPS en la cepa silvestre (2457T). Carril 1 y 2: 2457T; carril 3 y 4: 2457T/pJC114; carril 5 y 6 2457T/pJC139; carril 7 y 8: 2457T/pJC144. (B) Perfil de LPS de las cepas mutantes en los reguladores del largo de cadena WzzB (MSF102, carril 1), Wzz<sub>pHS2</sub> (MSF107, carril 2) o ambos reguladores (MSF209, carril 3). El LPS se analizó mediante SDS-PAGE/Tricina y cada carril se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.

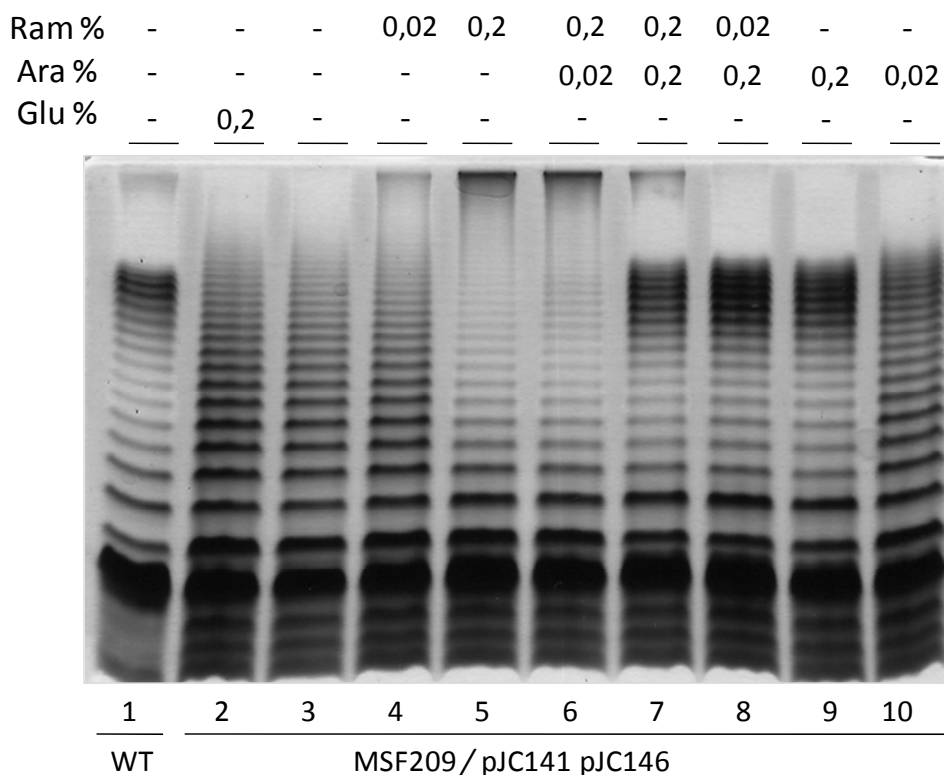
Estos resultados indican que no sólo los niveles de Wzy, sino también el de los reguladores es importante para determinar la distribución normal del AgO en *S. flexneri* 2a. Además, sugieren que existiría una competencia entre los reguladores para controlar la polimerización a un largo determinado. Como se ve en la figura 17A, carriles 5 y 6, la sobreexpresión de WzzB desplaza la síntesis de AgO hacia la moda S-AgO, observándose un fenotipo similar al de una mutante en el regulador Wzz<sub>pHS2</sub> (comparar con Fig. 17B, carril 2); en cambio, la sobreexpresión del regulador Wzz<sub>pHS2</sub> no logró desplazar completamente el AgO hacia la moda VL-AgO. Estos resultados sugirieron que WzzB tendría mayor afinidad por el control de Wzy que Wzz<sub>pHS2</sub>.

Para evaluar en forma más precisa esta posible diferencia de afinidad de los reguladores por el control de la polimerasa, se clonaron los marcos de lectura abierto de los genes *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>*, en el vector inducible pBAD24 generando los plasmidios pJC141 y pJC147 respectivamente. De esta forma se descartaría una diferencia de expresión por efecto del promotor silvestre de cada uno de estos genes. Cada plasmidio se transformó en su mutante respectiva, y se analizó el perfil del LPS en distintas condiciones de inducción (Fig. 18). Los resultados mostraron que hay una competencia de ambos reguladores por el control de la polimerización que depende de la cantidad de cada uno. Se observa que al ir aumentando gradualmente la expresión del regulador WzzB en la mutante MSF102 ( $\Delta wzzB$ ) comienza a desplazarse la moda VL-AgO hacia la síntesis de S-AgO (Fig 18A). Cuando se realiza la experiencia en forma inversa, al expresar controladamente el regulador Wzz<sub>pHS2</sub> en la mutante MSF107 ( $\Delta wzz_{pHS2}::aph$ ) comienza a desplazarse la moda S-AgO hacia la síntesis de VL-AgO (Fig. 18B). El resultado también sugiere que el regulador WzzB ejercería un mayor control de la polimerización, ya que al realizar una inducción de 0,2 % es casi indetectable la moda VL-AgO (Fig. 18A, carril 9), en cambio al inducir igualmente la producción de Wzz<sub>pHS2</sub>, la moda S-AgO aun está presente (Fig. 18B, carril 9).



**Figura 18.** Efecto de la expresión controlada mediante plasmidios inducibles de los reguladores WzzB o Wzz<sub>pHS2</sub> sobre el perfil de LPS en una cepa mutante  $\Delta wzzB$  (MSF102) o  $\Delta wzz_{pHS2}::aph$  (MSF107). En el carril 1 se muestra la cepa silvestre (WT). (A) Los carriles 2-9 muestran el efecto de la expresión controlada de WzzB (pJC142, pBAD24-wzzB) sobre la mutante  $\Delta wzzB$ . (B) Los carriles 2-9 muestran el efecto de la expresión controlada de Wzz<sub>pHS2</sub> (pJC147, pBAD24-wzz<sub>pHS2</sub>) sobre la mutante  $\Delta wzz_{pHS2}::aph$ . Se muestra en la parte superior las distintas condiciones de inducción o represión. Arabinosa (Ara), glucosa (Glu). El LPS se analizó mediante SDS-PAGE/Tricina y cada carril se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.

Para estudiar este fenómeno independiente de los reguladores nativos, se construyó una doble mutante que carece de los genes *wzzB* y *wzz<sub>pHS2</sub>* (MSF209) (Fig. 17B, carril 3). Esta mutante se utilizó para expresar controladamente los reguladores del largo de cadena mediante la utilización de plasmidios inducibles. Se construyeron los plasmidios pJC146 que contiene el gen *wzz<sub>pHS2</sub>* bajo el control del promotor inducible por ramnosa y el plasmidio pJC141 que contiene el gen *wzzB* bajo el promotor inducible por arabinosa. Ambos plasmidios poseen un número de copias moderado (30-55 copias por célula). Estos plasmidios se transformaron en la cepa doble mutante MSF209 y se analizó el perfil electroforético en distintas condiciones de inducción (Fig. 19). Los resultados muestran que el fenotipo de distribución no regulada, presentado por la cepa MSF209 (Fig. 19, carriles 2 y 3) se revierte al ir aumentando controladamente la expresión del *Wzz<sub>pHS2</sub>* mediante una inducción con ramnosa. Si observamos el carril 4 (0,02% de ramnosa), el AgO presenta una moda VL-AgO, pero la región de AgO de bajo peso molecular presenta un perfil similar a la doble mutante. Al aumentar a 0,2% la concentración de ramnosa (carril 5), se obtiene un fenotipo similar al de la mutante en  $\Delta wzzB$  (ver Fig. 17B, carril 1). Al inducir levemente el regulador *WzzB* con 0,02 % de arabinosa, en presencia de 0,2 % ramnosa, comienza a aparecer la moda S-AgO (carril 6). Cuando se aumentó la concentración de arabinosa a un 0,2 % en conjunto con 0,2 % de ramnosa, se observaron claramente ambas modas, con un fenotipo similar al de la cepa silvestre (Fig 19, comparar carril 7 y carril 1). Al disminuir la concentración de ramnosa a 0,02 % en presencia de arabinosa 0,2 % no se detectó la moda VL-AgO, lo mismo ocurrió cuando sólo se induce con 0,2 % de arabinosa (carril 9). Cuando se realizó una inducción solamente con 0,02 % de arabinosa se observó un fenotipo intermedio con menor presencia de S-AgO, ausencia VL-AgO y la región de AgO de bajo peso molecular con un perfil similar al de la cepa doble mutante. Estos resultados confirman la importancia de la razón entre ambos reguladores para obtener un fenotipo silvestre de LPS. Además, indican que es necesaria una alta expresión de ambos *Wzz* (alta inducción) para obtener un fenotipo similar al silvestre (Fig 19, carril 7).



**Figura 19.** Efecto de la expresión controlada de los reguladores del largo de cadena sobre el perfil de LPS en la cepa doble mutante  $\Delta wzzB wzz_{pHS2}::aph$  (MSF209). En el carril 1 se muestra la cepa silvestre (2457T), los carriles 2-10 muestran la cepa MSF209 con los plasmidios inducibles pJC146 (pSCRhaB- $wzz_{pHS2}$ ) y pJC141 (pBAD24- $wzzB$ ) con distintas condiciones de inducción o represión especificadas en la parte superior de cada carril. Glucosa (Glu), Arabinosa (Ara), los corchetes indican ambas modas. El LPS se analizó mediante SDS-PAGE/Tricina y cada carril se cargó con el LPS de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc.

### 3.9. Las proteínas Wzy y WzzB oligomerizan independientemente.

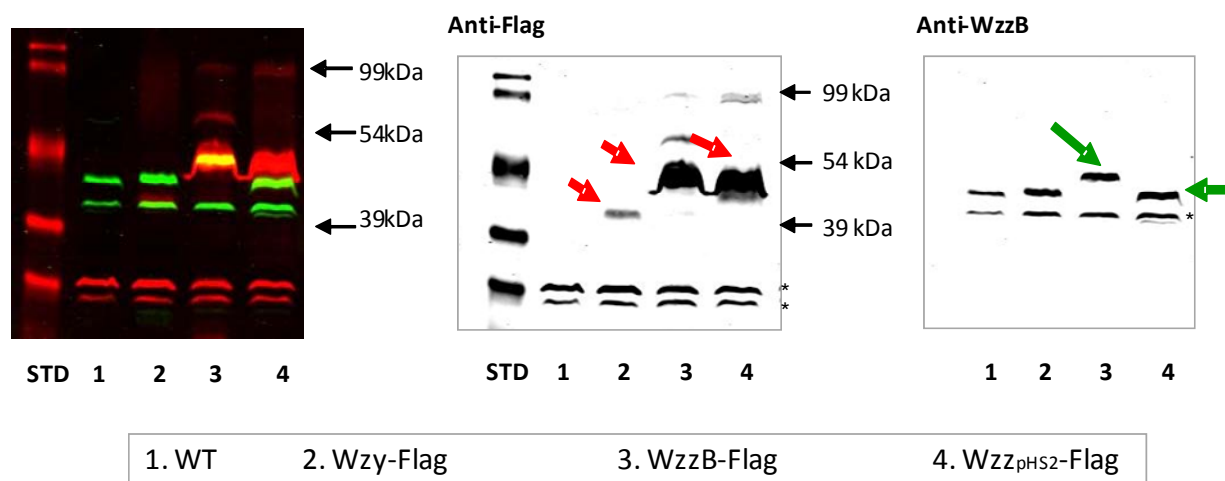
Debido a que existe la necesidad de un balance adecuado entre Wzy, WzzB y  $Wzz_{pHS2}$  para expresar un AgO normal, se propone que podrían estar interactuando físicamente formando un complejo, siendo parte de una maquinaria biosintética de AgO. Al respecto, sólo hay evidencias de la

oligomerización *in vivo* de WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub> en *S. flexneri* (Daniels & Morona, 1999; Purins *et al.*, 2008), y de Wzz en *E. coli* (Stenberg *et al.*, 2005) y *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2002). En esta Tesis, se realizaron experimentos de entrecruzamiento *in vivo* e *in vitro*. Los agentes entrecruzantes utilizados fueron formaldehído, DSG (Disuccinimidil glutarato), DSP (dithiobis[succinimidylpropionate]), EGS (Ethylene glycolbis[succinimidylsuccinate]). Estos compuestos son homofuncionales capaces de reconocer sitios blancos a distancias de 2 Å, 7,7 Å, 12 Å y 16,1 Å respectivamente, sin embargo el formaldehído tiene la particularidad de tener un rango variable, ya que es capaz de polimerizar (Daniels & Morona, 1999; Prossnitz *et al.*, 1988). Todos ellos reaccionan sólo con grupos aminos a excepción de formaldehído que además reacciona con grupos tioles.

El ensayo se realizó en la cepa *S. flexneri* wzy-Flag3x (MSF117) que expresa una proteína Wzy fusionada al epítipo comercial FLAG3x en el extremo C-terminal. Se optó por detectar la posible interacción entre Wzy y WzzB ya que según los resultados anteriores sería el conjunto que tendría mayor afinidad en comparación con la posible interacción entre Wzy-Wzz<sub>pHS2</sub>. Las proteínas Wzy y WzzB se detectaron mediante Western blot, utilizando los anticuerpos anti-FLAG y anti-Wzz. El anticuerpo anti-Wzz (donado por el Dr. M. Valvano) fue generado contra el loop periplasmático de Wzz de *E. coli*, y debido a la gran identidad de secuencia, permitió la detección de WzzB de *S. flexneri*. Los anticuerpos utilizados, anti-FLAG y anti-Wzz, son reconocidos por dos anticuerpos secundarios distintos (anti-ratón o anti-conejo) conjugados a los fluoróforos IRDye® 680, o IRDye® 800. Estos emiten a 710 nm y 795 nm, dando una señal roja o verde respectivamente, lo que permite diferenciar ambas señales en una misma membrana.

Para probar este sistema se obtuvieron proteínas de membrana de las cepas silvestre (2457T), Wzy-Flag3x (MSF117), WzzB-Flag3x (MSF103) y Wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x (MSF109) y se realizó un Western blot utilizando los anticuerpos anti-FLAG y anti-Wzz. La figura 20A muestra la detección de las proteínas con el epítipo FLAG3x (en rojo) y la proteína WzzB (en verde). Si separamos la señal podemos detectar individualmente, las proteínas que reaccionan con el anticuerpo anti-FLAG (Fig. 20B) y las que reaccionan con el anticuerpo anti-wzz (Fig. 20C). La proteína WzzB-Flag3x es detectada por los anticuerpos anti-Wzz y anti-FLAG (Fig. 20 panel C, carril 3 y panel B carril 3, respectivamente) generando una señal amarilla

(Fig20A, carril 3) que indica la colocalización de las dos señales. Esto se espera encontrar en los ensayos de entrecruzamiento.

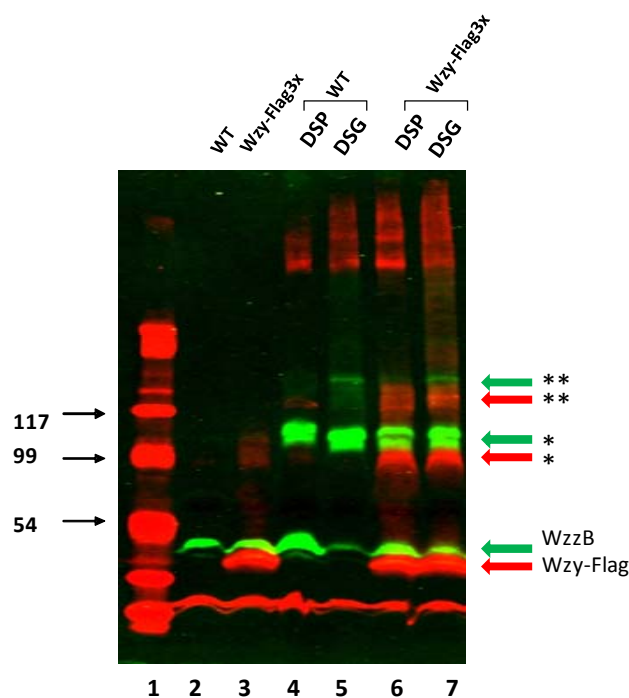


**Figura 20.** Detección simultánea de Wzy-Flag3x y WzzB mediante Western blot. Para este ensayo se utilizaron las cepas 2457T (wt), MSF117 (wzy-Flag3x), MSF103 (wzzB-Flag3x) y MSF109 (wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x). A) Detección de Wzy-Flag3x, WzzB, WzzB-Flag3x y Wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x. Se observa en verde la detección de WzzB y en rojo la detección de las proteínas marcadas con el epítopo FLAG. La señal amarilla corresponde a la detección de WzzB-Flag3x con ambos anticuerpos. En B) sólo se observan las señales que responden al anticuerpo anti-FLAG, y se señalan las proteínas Wzy-Flag3x, WzzB-Flag3x y Wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x con flecha roja (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). En C) se observan las señales correspondientes al anticuerpo anti-Wzz. Se pueden identificar las proteínas WzzB en las cepas WT (2457T), Wzy-Flag3x (MSF117), WzzB-Flag3x (MSF103) y Wzz<sub>pHS2</sub>-Flag3x (MSF109), carriles 1, 2, 3, 4, respectivamente. Los \* indican bandas inespecíficas detectadas por los anticuerpos anti-FLAG o anti-Wzz.



El entrecruzamiento *in vivo* se llevó a cabo tomando como base el protocolo desarrollado por Daniels & Morona (1999). Inicialmente se utilizaron dos agentes entrecruzantes homobifuncionales con grupos ésteres de N-hidroxisuccinimida. Estos grupos reaccionan covalentemente con los grupos NH<sub>2</sub> de las lisinas y del extremo amino terminal de las proteínas. Los entrecruzantes usados fueron DSP y DSG, con brazos espaciadores de 12 Å y 7,7 Å respectivamente.

Luego de realizar el entrecruzamiento *in vivo*, se obtuvieron las proteínas de membrana y se realizaron ensayos de Western blot. Con ambos agentes entrecruzantes se detectaron probables oligómeros y trímeros de Wzy y WzzB, correspondientes al doble o triple de su peso molecular, lo que sugiere una posible dimerización, trimerización o interacción con una o dos proteínas de un peso molecular similar (Fig. 21, carriles 4 al 7). Además, se observa una señal correspondiente a un probable dímero en el carril 3 (wzy-Flag3x) sin un agente entrecruzante. Esto indica que el dímero de Wzy resiste las condiciones denaturantes del gel, esto es similar a lo que ocurre con WzzB en *Shigella flexneri* 2a, en donde Daniels & Morona (1999) demostraron mediante un Western blot que WzzB es capaz de dimerizar en presencia de SDS, además de formar oligómeros más complejos utilizando agentes entrecruzantes. La banda correspondiente a la dimerización de WzzB presentó un duplete, lo que indicaría que aparte de una interacción WzzB-WzzB, existiría interacción con otra proteína de tamaño similar, que posiblemente también participa en la síntesis de AgO (Wzz<sub>pH52</sub>, Wzx, WaaL o WecA). A pesar de haberse reportado anteriormente la oligomerización de WzzB, la posible oligomerización de Wzy se logró en el desarrollo de esta Tesis.

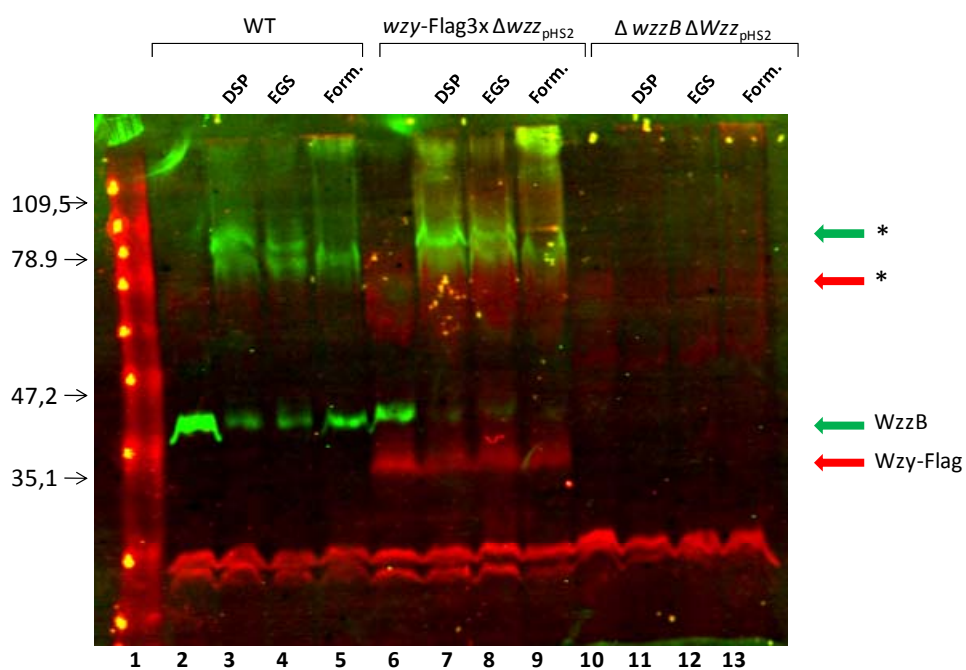


**Figura 21.** Entrecruzamiento *in vivo* utilizando DSP o DSG sobre las cepas WT (2457T) y *wzy*-Flag3x (MSF117). Se utilizó un gel SDS-PAGE (NOVAX® gradiente 4-12 %) y se cargaron muestras sin entrecruzar (carriles 2 y 3, cepas WT y *wzy*-Flag3x respectivamente) y entrecruzadas con DSP (carriles 4 y 6, cepas WT y *wzy*-Flag3x respectivamente) o con DSG (carriles 5 y 7, cepas WT y *wzy*-Flag3x respectivamente). Se señalan los posibles dímeros o trímeros con uno o dos asteriscos respectivamente (\*, \*\*). Carril 1 estándar de peso molecular.

No obstante, en este experimento no se logró detectar la colocalización de WzzB y Wzy. Una posible explicación para esto es que la presencia del regulador Wzz<sub>pHS2</sub> pueda estar desfavoreciendo la formación del complejo WzzB-Wzy, dificultando su detección.

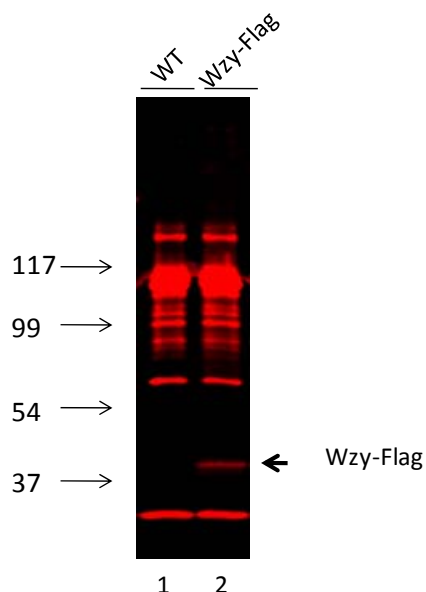
Para favorecer la posible interacción entre Wzy y WzzB se construyó la cepa *S. flexneri wzy*-Flag3x *wzz*<sub>pHS2</sub>::*aph* (MSF224). Esta cepa se utilizó en experimentos de entrecruzamiento utilizando los reactivos DSG, EGS, y formaldehído. Al igual que en el resultado anterior (Fig. 21), sólo se observó la oligomerización individual de ambas proteínas con los tres agentes entrecruzantes.

Para seguir intentando resolver la posible interacción entre Wzy y WzzB, se trabajó con extractos de proteínas de membrana y se realizó un ensayo de entrecruzamiento *in vitro*. Este ensayo de crosslinking *in vitro* también se realizó en ausencia de Wzz<sub>pHS2</sub>, con los agentes DSP, EGS, y formaldehído. El experimento se realizó según lo descrito por Scott *et al.* (2002) utilizando proteínas de membrana obtenidas de las cepas WT (2457T), *wzy-flag3x Δwzz<sub>pHS2</sub>::aph* (MSF224) y *ΔwzzB Δwzz<sub>pHS2</sub>::aph* (MSF209) (Fig. 22). El resultado mostró, al igual que el entrecruzamiento *in vivo*, a WzzB como monómero y como dímero, señal reconocida por el anticuerpo anti-Wzz y la proteína Wzy como monómero y una señal de alto peso molecular que podría corresponder a un dímero (carriles 6, 7, 8, 9). No obstante, no se detectó co-localización de ambas señales bajo estas condiciones.



**Figura 22.** Entrecruzamiento *in vitro* utilizando DSP, EGS, o formaldehído (Form) sobre proteínas de membranas obtenidas de las cepas WT (2457T), *wzy-Flag3x Δwzz<sub>pHS2</sub>::aph* (MSF224) y *ΔwzzB Δwzz<sub>pHS2</sub>::aph* (MSF209). Se realizó un gel SDS-PAGE 11 % y se cargó con muestras sin entrecruzar (carriles 2, 6 y 10, cepas 2457T, MSF224 y MSF209 respectivamente) y entrecruzadas con DSP (carriles 3, 7 y 11, cepas 2457T, MSF224 y MSF209 respectivamente), con EGS (carriles 4, 8 y 12, cepas 2457T, MSF224 y MSF209 respectivamente), o con formaldehído (carriles 5, 9 y 13, cepas 2457T, MSF224 y MSF209 respectivamente). Se señalan los posibles dímeros con un asterisco (\*).

Como otra alternativa para encontrar la interacción entre Wzy y WzzB, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Se utilizaron esferas de agarosa cubiertas con proteína G (Roche) asociadas al anticuerpo monoclonal Anti-Flag. En el ensayo se utilizaron los extractos de proteína de membrana de la cepa WT (2457T) y *wzy-Flag3x* (MSF117), las que se incubaron con las esferas. Luego de lavar y eluir, sólo se detectó la presencia de Wzy-Flag3x monomérica, la cual no co-precipitó con WzzB ya que este regulador no fue detectado por el anticuerpo anti WzzB (Fig. 23).



**Figura 23.** Inmunoprecipitación de Wzy-Flag3x. Se utilizaron extractos proteicos de la cepa WT (2457T, carril 1) y *wzy-Flag3x* (MSF117, carril 2) y mediante esferas de G-agarosa asociadas al anticuerpo monoclonal Anti-FLAG, se inmunoprecipitó *wzy-Flag3x*. Se realizó un Western blot contra Wzy-Flag3x (anti-FLAG) y WzzB (anti-Wzz). Se indican los pesos moleculares y la detección de Wzy-Flag.

Los resultados anteriores muestran que a pesar de las evidencias genéticas (Daniels & Morona, 1999; Daniels *et al.*, 2002; Marolda *et al.*, 2006b) y las teorías propuestas (Bastin *et al.*, 1993; Morona *et al.*, 1995; Tocilj *et al.*, 2008), no se detectó interacción entre Wzy y WzzB en las condiciones ensayadas en *S. flexneri 2a*.

## 4. Discusión

El lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la membrana externa y un importante factor de virulencia de las bacterias Gram negativo. Esta macromolécula está compuesta por tres dominios estructurales: i) el lípido A, región hidrofóbica anclada a la membrana interna; ii) el "core, " formado por heptosas y hexosas, que conecta al lípido A con el tercer componente iii) el antígeno O (AgO), una cadena de polisacáridos expuesta a la superficie bacteriana (Raetz & Whitfield, 2002; Valvano, 2003; Whitfield, 1995). Se ha reportado que no sólo la presencia de la cadena de AgO, sino también el número de unidades que la forman y el largo preferencial de las cadenas presentes en la superficie, son importantes para una infección exitosa (Hong & Payne, 1997; Van den Bosch *et al.*, 1997). Sin embargo, en contraste con la cantidad de información sobre los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de las proteínas de invasión de *S. flexneri* (Dorman & Porter, 1998; Sansonetti, 2001), poco se sabe de la regulación ambiental de la síntesis y la distribución de los largos de la cadena de AgO. La presente tesis doctoral se enfocó en el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de AgO de *S. flexneri*.

Uno de los factores involucrados en la regulación de la síntesis de componentes extracelulares en distintas enterobacterias, es el factor de antiterminación RfaH (Bailey *et al.*, 1997). Esta proteína permite la elongación de la transcripción, no sólo de los genes del "core" y AgO del LPS (Marolda & Valvano, 1998), sino que su función también se requiere para la expresión de cápsulas, flagelo y pili (Bailey *et al.*, 1992; Beutin & Achtman, 1979). Anteriormente en nuestro laboratorio se identificó el gen *rfaH* de *S. Typhi* Ty2 y se demostró que su función es esencial para la síntesis del LPS, ya que mutantes  $\Delta rfaH$  producen un LPS carente de AgO y un "core" truncado (Rojas *et al.*, 2001). Además, se determinó que *rfaH* es modulado por condiciones ambientales a lo largo del crecimiento bacteriano y esto se correlacionó con la expresión de los genes del operón del AgO de *S. Typhi* y la producción de este polímero, observándose un aumento de todas estas variables en fase estacionaria (Bittner *et al.*, 2002).

El AgO de *S. flexneri* 2a presenta dos largos preferenciales de cadena (distribución bi-modal), un AgO de 11-17 unidades repetidas (S-AgO) y otro de más de 90 unidades repetidas (VL-AgO). En este trabajo se analizó la producción de LPS en *S. flexneri* 2a durante el crecimiento, se observó una expresión diferencial de AgO: mientras la región VL-AgO aumentaba en fase exponencial tardía y fase estacionaria, la región S-AgO permanecía relativamente constante a lo largo del crecimiento.

Cuando se analizó la transcripción de *rfaH* en *S. flexneri* mediante una fusión del promotor del gen *rfaH* al reportero *LacZ*, se observó un aumento significativo en fase exponencial tardía y en fase estacionaria. Lo mismo ocurrió cuando se analizó el nivel celular de RfaH mediante una fusión traduccional de la proteína RfaH con el epítipo comercial FLAG®. Este aumento se correlacionó con la mayor producción de VL-AgO durante el crecimiento.

Debido a la presencia de la secuencia *ops* en el operón *wba*, responsable de la síntesis de AgO, se pensó que RfaH podría estar directamente involucrado en la producción de AgO en *S. flexneri*. Para estudiar esta hipótesis se realizó una mutación del gen *rfaH* y se analizó la producción de AgO. Se observó que la ausencia de RfaH producía una disminución considerable de la producción de AgO y un claro defecto en la polimerización, con predominio de LPS no sustituido o con 1-3 unidades repetidas de AgO. Se perdió la regulación diferencial de la bi-modalidad, y sólo se observó S-AgO. El fenotipo del LPS de la mutante  $\Delta rfaH$  (MSF487) no se atribuyó a un déficit en la expresión de los reguladores del largo de cadena, ya que no se observó una diferencia en la expresión de *wzzB* o *wzz<sub>pHS2</sub>* en la cepa silvestre y la mutante  $\Delta rfaH$ .

El efecto de la mutación fue muy distinto a lo observado en *S. Typhi* Ty2, en donde la mutante  $\Delta rfaH$  no produce AgO (Rojas *et al.*, 2001). Esto se debe probablemente a la diferencia en la cantidad de genes y la organización genética del operón *wba* en ambas especies. Ambos operones codifican las enzimas necesarias para sintetizar los azúcares y estructurar las unidades de AgO. Sin embargo, en el caso de *S. Typhi* Ty2, el operón posee 17 genes (18,8 kb) (Deng *et al.*, 2003), en tanto que en *S. flexneri* presenta sólo 8 genes (7,7 kb) (Wei *et al.*, 2003). Por lo tanto, la transcripción completa del operón *wba* de *S. Typhi* Ty2 sería más dependiente de la actividad del antiterminador RfaH. Por otra parte, el último

gen del operón *wba* de *S. Typhi* Ty2 es *wbaP*, que codifica para la enzima encargada del primer paso de síntesis de la unidad de AgO, por lo tanto, su ausencia impide la síntesis de las unidades de AgO (Saldias *et al.*, 2008). En cambio, el último gen del operón *wba* en *S. flexneri* es *wzy*, que codifica para la polimerasa del AgO (Morona *et al.*, 1995). Por lo tanto, en la mutante MSF487 (*S. flexneri*  $\Delta rfaH$ ) la menor transcripción del operón afectaría fuertemente la expresión de *wzy* y, en consecuencia, habría una disminución en la polimerización del AgO. Esta hipótesis se comprobó, al demostrar que la ausencia de *rfaH* produjo una drástica disminución de la expresión de *wzy*, la cual fue cerca de 100 veces menor que en la cepa silvestre, y lo mismo sucedió con la síntesis de la proteína Wzy en ausencia de RfaH. Además, el requerimiento de RfaH para la expresión de *wzy* se puede explicar por la presencia de secuencias de término a lo largo del operón *wba*. El análisis bioinformático demostró la presencia de 6 posibles terminadores con un índice de confianza (IC) mayor a 60. Precisamente, en la secuencia que incluye el gen *wzy*, existen dos posibles terminadores y uno de ellos con un índice de confianza de 100. La metodología usada en esta Tesis para la detección de secuencias que posiblemente produzcan pausas en la transcripción se ve avalada por un estudio realizado por Castillo *et al.* (2008) quienes mostraron experimentalmente que un terminador intrínseco intragénico en *H. pylori* detectado por bioinformática, produce efectivamente terminación de la transcripción.

Cuando se complementó la mutante MSF487 con el gen *rfaH* clonado en un plasmidio multicopia, se recuperó la expresión de *wzy*. Sin embargo, aunque la complementación fue significativa, los niveles de transcrito fueron de un 40% respecto a la cepa silvestre. Una explicación para este resultado podría ser que, debido a que RfaH controla la expresión de un gran número de componentes de membrana (Bailey *et al.*, 1997), la delección o sobreexpresión de este regulador podría generar una respuesta a estrés de membrana para mantener la homeostasis celular. En esta línea, dos estudios recientes mostraron que mostraron que, en *S. Typhimurium* la pérdida de *rfaH* no sólo tiene un impacto sobre genes involucrados en la síntesis de LPS, sino también tiene un efecto indirecto en numerosos componentes de membrana que participan en quimiotaxia, formación del flagelo y del Sistema de Secreción Tipo III (Nagy *et al.*, 2006) y en *Y. enterocolitica* la sobreexpresión de Wzz produce estrés de membrana, que activa el sistema de dos componentes CpxAR, afectando además la expresión del operón *wba* (Bengoechea *et al.*, 2002). Otra explicación podría ser que la incompleta complementación de la

mutante MSF487 podría deberse a un efecto cis producto de la ausencia del gen *rfaH* en su propio contexto genético. Un experimento preliminar que apoya esta hipótesis mostró que la complementación de la cepa silvestre con el plasmidio pJC75 aumenta significativamente el nivel de transcrito de *wzy* por sobre la expresión de la cepa silvestre (resultados no mostrados), descartando la idea de stress de membrana.

Cuando se analizó el nivel de transcrito de *wzy* en la cepa silvestre, se observó consistentemente un aumento cercano al 20 % en fase estacionaria comparado con fase exponencial, lo que correlaciona con el aumento de la transcripción de *rfaH* en esta fase. Esto concuerda con lo descrito por Bittner *et al.* (2002) que mostraron un aumento del nivel de transcrito de *wbaP*, último gen del operon *wba* de *S. Typhi* Ty2 en fase estacionaria, correlacionándolo con una mayor transcripción de *rfaH* durante esta fase de crecimiento.

Cuando se sobreexpresó *wzy* en la mutante  $\Delta rfaH$ , se logró la expresión de AgO de alto peso molecular, sin embargo, se observó un perfil electroforético distinto al silvestre sin una clara definición de las dos modas. Al expresar controladamente el gen *wzy*, en la cepa mutante MSF114 (*S. flexneri*  $\Delta wzy$ ) mediante un plasmidio inducible (pJC115), a un bajo nivel de expresión de *wzy* se observó sólo S-AgO, pero al incrementar el nivel de inducción aparecieron ambas modas (S-AgO y VL-AgO). Todos estos resultados indican que los niveles de *wzy* son importantes para determinar un LPS normal. Además, nos hacen pensar que el nivel de *wzy* debe estar muy regulado para lograr el nivel de polimerización presente en la cepa silvestre y subrayan la importancia de la actividad de RfaH en la regulación de la transcripción de la polimerasa del AgO.

La expresión del gen *wzy* en *S. flexneri* es muy baja. Mediante ensayos de Northern blot sólo se detectó el transcrito en la cepa que sobreexpresa *wzy* (resultados no mostrados). Lo mismo ocurre con el nivel de la proteína Wzy; Daniels & Morona (1999) sólo lograron detectarla levemente mediante Western blot cuando se cambiaron los codones infrecuentes ATA<sub>4</sub>, ATA<sub>9</sub>, AGA<sub>23</sub>, presentes en los primeros 25 aminoácidos. Tras hacer un análisis de la presencia de los codones infrecuentes en el gen *wzy*, se encontró un gran número de éstos a lo largo de todo el transcrito, alrededor de un 25,4 % de los



codones presentes en el transcrito son utilizados con una frecuencia menor a 25 % en el genoma de *S. flexneri* 2a. Interesantemente los transcritos que codifican para la polimerasa Wzy en *S. Typhi* y *S. Typhimurium* contienen un número similar de codones infrecuentes. Al contrario, proteínas de membrana altamente expresadas como por ejemplo OmpA y OmpC, tras ser sujetas al mismo análisis, mostraron sólo 0,9% y 1,4% respectivamente, de codones con una frecuencia de utilización de menos de un 25% a lo largo de todo el transcrito.

En base a lo mencionado anteriormente, el nivel de expresión de Wzy podría regularse por la presencia de codones infrecuentes en los primeros 25 tripletes (ATA<sub>4</sub>,ATA<sub>9</sub>,AGA<sub>23</sub>). Esto, sumado a la ausencia de un sitio de unión a ribosoma característico, contribuiría a una disminuida expresión de Wzy en *S. flexneri* (Daniels *et al.*, 1998). Esto concuerda con lo descrito por Chen *et al.* (Chen & Inouye, 1990) en *E. coli*, quienes encontraron que los primeros 25 codones infrecuentes, especialmente AGA/AGG, cumplen un rol regulatorio modulando la estabilidad del complejo de iniciación para la síntesis proteica. Lo mismo encontraron Goldman *et al.* (1995), con la presencia de CUA que codifica para leucina. La topología de Wzy es compleja, presenta 12 dominios transmembrana y un gran segmento periplasmático (Daniels *et al.*, 1998), por lo tanto el plegamiento correcto sería crucial para su funcionalidad. Se encontraron regiones de codones infrecuentes que coinciden con los dominios TM I, II, III, IV, V, VII, IX, X, XI, XII y la parte final del segmento periplasmático entre los dominios IX y X. Adicionalmente, nuestro análisis mostró una agrupación de codones infrecuentes en el dominio TM IV, que podría contribuir a la formación de la estructura de horquilla detectada mediante bioinformática (Ver Fig 14), aumentando el tiempo de la pausa (Thanaraj & Argos, 1996). Los resultados de este análisis, sugieren que estas regiones podrían estar contribuyendo a generar pausas traduccionales que ayuden al correcto plegamiento de Wzy. Si consideramos que existe una posible participación de Wzy en un complejo multiproteico junto a Wzz, Wzx y quizás Waal (Daniels *et al.*, 1998; Marolda *et al.*, 2006b), el plegamiento correcto sería crucial para poder interactuar con todas estas proteínas. Esto está en línea con lo descrito por Purvis *et al.* (1987), quienes demostraron que la enzima piruvato quinasa presenta 5 codones infrecuentes “en tándem” en su transcrito, disposición que coincide con la separación de los dominios catalíticos y alostéricos presentes en la proteína, sugiriendo que la pausa generada durante la traducción sería de gran importancia para el correcto plegamiento del dominio catalítico. Además, Crombie *et al.* (1992),

demonstraron que la enzima TRP3 de *Saccharomyces cerevisiae* presenta en su transcrito una acumulación de 10 codones infrecuentes dentro del segundo dominio funcional. Cuando se cambiaron los codones infrecuentes por codones frecuentes, sin cambiar la secuencia aminoacídica, se obtuvo una proteína funcional que lograba complementar la mutante. Sin embargo, esta proteína tenía menor actividad, indicando que la presencia de estos codones, favorecen la obtención de una proteína 100 % funcional.

Como se discutió antes, los resultados de este trabajo demuestran que el nivel de Wzy es importante no sólo para la polimerización del AgO, sino que también influencia el largo preferencial de la cadena. Así, al sobreexpresar Wzy, la polimerización del AgO se desacopla de la regulación mediada por ambos determinantes del largo de cadena (WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub>). Estos resultados se ajustan a la hipótesis sobre el mecanismo de regulación de la polimerización de AgO por Wzz propuesto por Morona *et al.* (1995) y concuerdan con los resultados obtenidos por Daniels *et al.* (1998). La hipótesis indica que Wzz actuaría como una chaperona molecular, facilitando la interacción entre la polimerasa y la ligasa formando un complejo. La proporción específica entre la polimerasa y la ligasa en el complejo, determinaría la cinética de la reacción de ligación, permitiendo la producción de un AgO con un largo preferencial específico. Por lo tanto, un aumento del nivel celular de Wzy, descontrola la regulación del largo de cadena. Esto puede explicar el estricto control transcripcional y traduccional de la polimerasa. Además, sugiere que el balance entre Wzy y los reguladores del largo de cadena es crucial para determinar una distribución de AgO normal.

La importancia del nivel de los reguladores del largo de cadena se estudió sobreexpresando los genes en la cepa silvestre y analizando el fenotipo del LPS. La sobreexpresión de WzzB produce AgO sin VL-AgO, en cambio la sobreexpresión de Wzz<sub>pHS2</sub> produce AgO con mayor cantidad de VL-AgO, y poca producción de S-AgO. Estos resultados apoyan la hipótesis de Stevenson *et al.* (1995), que propone que Wzz<sub>pHS2</sub> no compite eficientemente contra WzzB para influenciar la distribución del largo de cadena de AgO en *S. flexneri*. Murray *et al.* (2003) indican que la sobreexpresión de FepE en *S. Typhimurium* también desplaza la síntesis de AgO hacia VL-AgO. Para estudiar más a fondo la competencia entre los reguladores del largo de cadena, se clonaron en plasmidios inducibles ambos genes y se expresaron

reguladamente en la doble mutante que carece de ambos reguladores. Se observó que en ausencia o baja expresión de un regulador, se favorece la distribución de AgO determinada por el otro regulador. Así, la competencia de ambos reguladores por el control de la polimerización sugiere una posible interacción entre las proteínas Wzy, WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub>, existiendo una preferencia por WzzB.

Para estudiar la posible interacción de Wzy y WzzB, se realizaron experimentos de entrecruzamiento y se detectaron las proteínas Wzy y WzzB. El resultado no mostró una clara interacción entre ellas, pero mostró que Wzy y WzzB eran capaces de formar complejos de mayor peso molecular de aproximadamente el doble y triple de su tamaño, indicando una posible formación de oligómeros formados por la misma proteína o con otra proteína de un peso similar. Estos resultados concuerdan con lo observado por Daniels & Morona (1999) que observaron la oligomerización de Wzz en *S. flexneri*, aún en ausencia de un agente entrecruzante, y esa capacidad era indispensable para su funcionalidad. Recientemente, Purins *et al.* (2008) demostraron que Wzz<sub>pHS2</sub> también es capaz oligomerizar.

A pesar que los resultados no mostraron una interacción entre Wzy y Wzz, existe evidencia genética que sugiere la formación de un complejo multiproteico encargado de la síntesis de AgO (Daniels & Morona, 1999; Daniels *et al.*, 2002; Marolda *et al.*, 2006b; Morona *et al.*, 1995). Daniels & Morona (1999), observaron la oligomerización de WzzB, y proponen la participación de Wzy y WaaL en los oligómeros de alto peso molecular. El AgO de *Pseudomonas aeruginosa* es regulado por dos determinantes del largo de cadena (Wzz<sub>1</sub> y Wzz<sub>2</sub>) y en un estudio realizado por Daniels *et al.* (2002) sugieren que ambos reguladores serían parte de dos complejos independientes, debido a que la oligomerización de cada uno de ellos, detectada mediante Western blot, presenta distinta migración.

Si bien se propone la interacción entre Wzy y WzzB, es posible que esta interacción no sea permanente, debido a que aparte de las modas S-AgO y VL-AgO, siempre existen polímeros de AgO de distintos tamaños. Por lo tanto, podrían existir complejos más estables con otras proteínas involucradas en la síntesis de AgO (WecA, Wzx, WaaL) con la polimerasa o los reguladores del largo de cadena. En este sentido, recientemente Saldías *et al.* (2008) observaron que en *S. Typhimurium* LT2, el segmento periplasmático presente en WbaP (homólogo a WecA), enzima que inicia la síntesis de AgO, participa de

alguna manera en la regulación modal de AgO, ya que una mutante que carece de este segmento presentó una distribución modal alterada.

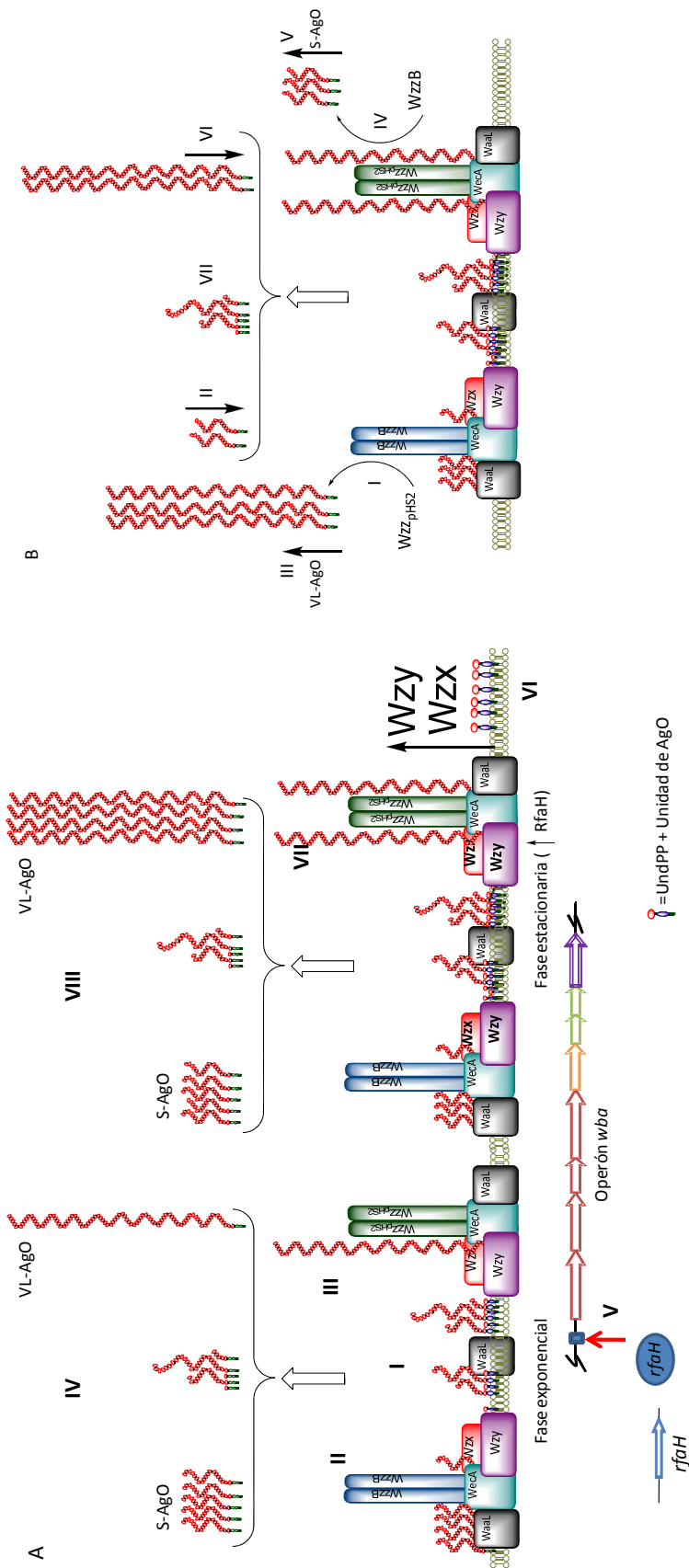
Los pesos moleculares de las enzimas involucradas en la síntesis de AgO (Wzx, WaaL, WecA, Wzz, Wzy) son similares, y no se descarta que los oligómeros encontrados de *wzy* en esta tesis, pudieran corresponder a interacción de la polimerasa con alguna otra proteína del sistema de síntesis de AgO. En el caso de la oligomerización de WzzB, lo más probable es que sea un oligómero puro, ya que en un trabajo descrito por Stenberg *et al.* (2005), se analizó el oligómero de Wzz en *E. coli* mediante espectrometría de masa y se concluyó que estaba formado sólo por la proteína Wzz. Además de las interacciones proteína – proteína, estudios de entrecruzamiento e inmuno precipitación demostraron que el AgO podría estar físicamente interactuando *in vivo* con el posible complejo proteico (Daniels *et al.*, 2002), y también se determinó que Wzz es capaz de interactuar con la cadena de AgO *in vitro* (Guo *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007). No obstante, a pesar de toda esta evidencia, nadie ha logrado determinar una interacción entre distintas proteínas involucradas en la síntesis de AgO.

El trabajo realizado en esta Tesis demuestra el complejo mecanismo regulatorio de la síntesis y determinación del largo de cadena de AgO en *S. flexneri* 2a. El AgO ha demostrado ser muy relevante en el proceso de infectivo invasión de *S. flexneri*. En este contexto, se ha visto que es necesaria la presencia de S-AgO para la correcta movilización y diseminación de la bacteria en células epiteliales; por otra parte, el VL-AgO otorga una importante resistencia al suero. Un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio, describió en *S. Typhimurium* y *S. Typhi*, que no sólo la distribución modal del AgO, sino también la densidad del polímero es importante para la resistencia al suero, resultado reflejado en una mayor resistencia en fase estacionaria. Además al complementar la cepa *S. Typhi* con el regulador FepE que produce un antígeno O de alto peso molecular (VL-AgO) en *S. Typhimurium*, se observa la producción de VL-AgO en *S. Typhi*, generando a su vez una mayor resistencia al complemento (Bravo *et al.*, 2008).

Durante el proceso infectivo, *S. flexneri* enfrenta variadas condiciones ambientales a las cuales la bacteria debe responder adaptando sus componentes de membrana. Por ejemplo resultados no

publicados de nuestro laboratorio han demostrado que el pH ácido produce en *S. flexneri*, una alteración de la moda S-AgO redistribuyéndola levemente hacia un AgO de aproximadamente 19 unidades repetidas. Por otra parte, muestras de LPS de *S. flexneri* obtenidas desde macrófagos infectados, mostraron la ausencia de VL-AgO, lo que indica un dinamismo de la molécula de AgO que ayudaría al proceso infectivo. El presente trabajo demostró la participación de RfaH y cómo este regulador global de la expresión de componentes de superficie en enterobacterias, responde a las condiciones de la fase estacionaria de cultivo. El aumento de RfaH en estas condiciones se traduce en una mayor expresión de los genes involucrados en la síntesis y polimerización de las unidades de AgO, siendo esencial para la expresión del gen de la polimerasa *wzy*. El nivel de polimerasa (Wzy), a su vez, resultó ser muy relevante para la apropiada distribución modal del AgO. Los resultados de esta Tesis también aportan a comprender los mecanismos que determinan el largo del polímero. En este sentido, los resultados sugieren que no habría interacción directa de la polimerasa con la proteína WzzB, la cual posiblemente interactuaría con otra molécula de la biosíntesis o ensamblaje del AgO, posiblemente el propio polímero y la ligasa WaaL (ver modelo propuesto).

Considerando que la distribución de los largos de cadena es dinámica e importante durante el ciclo infectivo de *S. flexneri*, la búsqueda y/o desarrollo de sustancias que interfieran el funcionamiento de las unidades de síntesis y ensamblaje del AgO podría ser de gran utilidad para comprender esta infección y, eventualmente, como terapia para tratarla. Por otra parte, la importancia del AgO como factor de virulencia lo sitúa como un potencial blanco para el desarrollo de vacunas para prevenir esta infección de alta prevalencia en nuestra región.



**Figura 24.** Modelo de la regulación de la síntesis de AgO en *S. flexneri* 2a. **(A)** Para explicar la regulación fase dependiente del AgO se propone lo siguiente: en fase exponencial, hay una limitación de polímero naciente producto de una disminuida disponibilidad de sustrato (UndPP + unidad de AgO) y de enzimas encargadas de translocar (Wzx) y polimerizar (Wzy) las unidades de AgO (enzimas codificadas en el operon *wba*). Además de producirse una polimerización y ligación independiente de los reguladores Wzz (I), el polímero está expuesto al control del regulador WzzB (II) y Wzz<sub>pHS2</sub> (III). Dado que las cadenas reguladas por WzzB son considerablemente más cortas que las reguladas por Wzz<sub>pHS2</sub>, éstas se completan y ligación mayor frecuencia y el polímero naciente es controlado principalmente por WzzB. Así, en fase exponencial se obtiene finalmente, AgO aleatorio, gran cantidad de S-Ago y escasa cantidad de VL-Ago (IV). En fase estacionaria, hay un aumento de la expresión de RfaH (V), que produce un aumento de las enzimas involucradas en la síntesis, translocación y polimerización del AgO (VI) generando mayor sustrato disponible (UndPP + unidad de AgO). En consecuencia, habría una mayor cantidad de polímeros nacientes disponibles para las unidades de ensamblaje controladas por Wzz<sub>pHS2</sub> (VII). El resultado es un aumento de VL-Ago (VIII). **(B)** La competencia observada entre los reguladores del largo de cadena por el control de la polimerización, se puede explicar de la siguiente manera: Si se sobreexpresa el regulador Wzz<sub>pHS2</sub>, éste es capaz de desplazar a WzzB (I), evitando su acción con la consecuente disminución de S-Ago (II) y aumento de VL-Ago (III). Por el contrario, al sobreexpresar el regulador WzzB, este desplaza a Wzz<sub>pHS2</sub> (IV), lo que produce un aumento de S-Ago (V) y una disminución de VL-Ago (VI). Además, también hay producción de polímero que escapa a la regulación de ambos determinantes de cadena (VII).

## 5. Conclusiones

La distribución modal del AgO de *S. flexneri* 2a es regulada diferencialmente durante el crecimiento bacteriano. La moda VL-AgO aumenta en fase exponencial tardía y estacionaria, mientras que la moda S-AgO permanece constante a lo largo de todo el crecimiento.

La regulación fase-dependiente de la síntesis de VL-AgO se correlaciona con la expresión y el nivel celular del factor de elongación de la transcripción RfaH.

La función del gen *rfaH* es esencial para la apropiada síntesis y distribución modal del AgO. Su ausencia afecta severamente el nivel de expresión del gen *wzy*, que codifica para la polimerasa del AgO (Wzy). La expresión de Wzy está finamente regulada y su nivel de expresión determina la aparición de los largos preferenciales de cadena del AgO.

El balance entre los niveles de Wzy y de los reguladores del largo de cadena WzzB y Wzz<sub>pHS2</sub> es crucial para determinar una distribución normal de AgO.

Ensayos de entrecruzamiento mostraron que las proteínas WzzB y Wzy son capaces de formar, independientemente, estructuras de mayor peso molecular correspondientes a un dímero o un trímero. Alternativamente, no se descarta la interacción con otras proteínas de peso molecular similar que participan de la síntesis de AgO (WecA, Wzx, WaaL).

## 6. Bibliografía

- Artsimovitch, I. & Landick, R. (2000).** Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7090-7095.
- Artsimovitch, I. & Landick, R. (2002).** The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand. *Cell* **109**, 193-203.
- Bailey, M. J., Koronakis, V., Schmoll, T. & Hughes, C. (1992).** *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol Microbiol* **6**, 1003-1012.
- Bailey, M. J., Hughes, C. & Koronakis, V. (1997).** RfaH and the *ops* element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol* **26**, 845-851.
- Bastin, D. A., Stevenson, G., Brown, P. K., Haase, A. & Reeves, P. R. (1993).** Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol Microbiol* **7**, 725-734.
- Bengoechea, J. A., Zhang, L., Toivanen, P. & Skurnik, M. (2002).** Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol* **44**, 1045-1062.
- Beutin, L. & Achtman, M. (1979).** Two *Escherichia coli* chromosomal cistrons, *sfrA* and *sfrB*, which are needed for expression of F factor *tra* functions. *J Bacteriol* **139**, 730-737.
- Bittner, M., Saldias, S., Estevez, C., Zaldivar, M., Marolda, C. L., Valvano, M. A. & Contreras, I. (2002).** O-antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi is regulated by nitrogen availability through RpoN-mediated transcriptional control of the *rfaH* gene. *Microbiology* **148**, 3789-3799.
- Bravo, D., Silva, C., Carter, J. A., Hoare, A., Alvarez, S. A., Blondel, C. J., Zaldivar, M., Valvano, M. A. & Contreras, I. (2008).** Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J Med Microbiol* **57**, 938-946.
- Cardona, S. T. & Valvano, M. A. (2005).** An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid* **54**, 219-228.
- Castillo, A. R., Arevalo, S. S., Woodruff, A. J. & Ottemann, K. M. (2008).** Experimental analysis of *Helicobacter pylori* transcriptional terminators suggests this microbe uses both intrinsic and factor-dependent termination. *Mol Microbiol* **67**, 155-170.
- Ciampi, M. S. (2006).** Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**, 2515-2528.
- Collins, L. V. & Hackett, J. (1991).** Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**, 2521-2529.



- Crombie, T., Swaffield, J. C. & Brown, A. J. (1992).** Protein folding within the cell is influenced by controlled rates of polypeptide elongation. *J Mol Biol* **228**, 7-12.
- Chen, G. F. & Inouye, M. (1990).** Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res* **18**, 1465-1473.
- Chen, G. T. & Inouye, M. (1994).** Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **8**, 2641-2652.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Daniels, C., Vindurampulle, C. & Morona, R. (1998).** Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Mol Microbiol* **28**, 1211-1222.
- Daniels, C. & Morona, R. (1999).** Analysis of *Shigella flexneri* wzz (Rol) function by mutagenesis and cross-linking: Wzz is able to oligomerize. *Mol Microbiol* **34**, 181-194.
- Daniels, C., Griffiths, C., Cowles, B. & Lam, J. S. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen chain length is determined before ligation to lipid A core. *Environ Microbiol* **4**, 883-897.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- Delgado, M. A., Mouslim, C. & Groisman, E. A. (2006).** The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol* **60**, 39-50.
- Deng, W., Liou, S. R., Plunkett, G., 3rd, Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C. & Blattner, F. R. (2003).** Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* **185**, 2330-2337.
- Dorman, C. J. & Porter, M. E. (1998).** The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol* **29**, 677-684.
- DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B. & Formal, S. B. (1989).** Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* **159**, 1126-1128.
- Feldman, M. F., Wacker, M., Hernandez, M. & other authors (2005).** Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3016-3021.
- Goldman, E., Rosenberg, A. H., Zubay, G. & Studier, F. W. (1995).** Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **245**, 467-473.
- Gorden, J. & Small, P. L. (1993).** Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* **61**, 364-367.
- Groisman, E. A. (2001).** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835-1842.

- Guo, H., Lokko, K., Zhang, Y., Yi, W., Wu, Z. & Wang, P. G. (2006).** Overexpression and characterization of Wzz of *Escherichia coli* O86:H2. *Protein Expr Purif* **48**, 49-55.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130.
- Hilbi, H., Moss, J. E., Hersh, D. & other authors (1998).** *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* **273**, 32895-32900.
- Hong, M. & Payne, S. M. (1997).** Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol Microbiol* **24**, 779-791.
- Jennison, A. V. & Verma, N. K. (2004).** *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 43-58.
- Jimenez, N., Canals, R., Salo, M. T., Vilches, S., Merino, S. & Tomas, J. M. (2008).** The *Aeromonas hydrophila* wb\*O34 gene cluster: genetics and temperature regulation. *J Bacteriol* **190**, 4198-4209.
- Kingsford, C. L., Ayanbule, K. & Salzberg, S. L. (2007).** Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol* **8**, R22.
- Koop, A. H., Hartley, M. E. & Bourgeois, S. (1987).** A low-copy-number vector utilizing beta-galactosidase for the analysis of gene control elements. *Gene* **52**, 245-256.
- Leeds, J. A. & Welch, R. A. (1997).** Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *J Bacteriol* **179**, 3519-3527.
- Lerouge, I., Laeremans, T., Verreth, C., Vanderleyden, J., Van Soom, C., Tobin, A. & Carlson, R. W. (2001).** Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *Ips* mutant deficient in O-antigen. *J Biol Chem* **276**, 17190-17198.
- Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E. & Apicella, M. A. (1990).** Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods* **126**, 109-117.
- Liu, B., Knirel, Y. A., Feng, L., Perepelov, A. V., Senchenkova, S. N., Wang, Q., Reeves, P. R. & Wang, L. (2008).** Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 627-653.
- Lukomski, S., Hull, R. A. & Hull, S. I. (1996).** Identification of the O antigen polymerase (*rfc*) gene in *Escherichia coli* O4 by insertional mutagenesis using a nonpolar chloramphenicol resistance cassette. *J Bacteriol* **178**, 240-247.
- Mantis, N., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. (1996).** Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **64**, 2474-2482.
- Marin, M. (2008).** Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnol J* **8**, 1047-1057.

- Marolda, C. L. & Valvano, M. A. (1998).** Promoter region of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide gene cluster: structural and functional characterization of an upstream untranslated mRNA sequence. *J Bacteriol* **180**, 3070-3079.
- Marolda, C. L., Lahiry, P., Vines, E., Saldias, S. & Valvano, M. A. (2006a).** Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol* **347**, 237-252.
- Marolda, C. L., Tatar, L. D., Alaimo, C., Aebi, M. & Valvano, M. A. (2006b).** Interplay of the Wzx translocase and the corresponding polymerase and chain length regulator proteins in the translocation and periplasmic assembly of lipopolysaccharide O antigen. *J Bacteriol* **188**, 5124-5135.
- Menard, R., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993).** Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* **175**, 5899-5906.
- Miller, J. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Morona, R., Mavris, M., Fallarino, A. & Manning, P. A. (1994).** Characterization of the *rfc* region of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **176**, 733-747.
- Morona, R., van den Bosch, L. & Manning, P. A. (1995).** Molecular, genetic, and topological characterization of O-antigen chain length regulation in *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **177**, 1059-1068.
- Morona, R., Daniels, C. & Van Den Bosch, L. (2003).** Genetic modulation of *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide O antigen modal chain length reveals that it has been optimized for virulence. *Microbiology* **149**, 925-939.
- Moss, J. E., Fisher, P. E., Vick, B., Groisman, E. A. & Zychlinsky, A. (2000).** The regulatory protein PhoP controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* **2**, 443-452.
- Murray, G. L., Attridge, S. R. & Morona, R. (2003).** Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol* **47**, 1395-1406.
- Nagy, G., Danino, V., Dobrindt, U., Pallen, M., Chaudhuri, R., Emody, L., Hinton, J. C. & Hacker, J. (2006).** Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect Immun* **74**, 5914-5925.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. (2000).** Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 292.
- Nieto, J. M., Bailey, M. J., Hughes, C. & Koronakis, V. (1996).** Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol Microbiol* **19**, 705-713.
- Okada, N., Sasakawa, C., Tobe, T., Yamada, M., Nagai, S., Talukder, K. A., Komatsu, K., Kanegasaki, S. & Yoshikawa, M. (1991).** Virulence-associated chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. *Mol Microbiol* **5**, 187-195.

- Pedersen, S. (1984).** *Escherichia coli* ribosomes translate in vivo with variable rate. *EMBO J* **3**, 2895-2898.
- Perdomo, O. J., Cavaillon, J. M., Huerre, M., Ohayon, H., Gounon, P. & Sansonetti, P. J. (1994).** Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med* **180**, 1307-1319.
- Phoenix, D. A. & Korotkov, E. (1997).** Evidence of rare codon clusters within *Escherichia coli* coding regions. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 63-66.
- Pradel, E. & Schnaitman, C. A. (1991).** Effect of *rfaH* (*sfrB*) and temperature on expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**, 6428-6431.
- Preston, A. & Maskell, D. J. (2002).** Molecular genetics and role in infection of environmentally regulated lipopolysaccharide expression. *Int J Med Microbiol* **292**, 7-15.
- Prossnitz, E., Nikaido, K., Ulbrich, S. J. & Ames, G. F. (1988).** Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **263**, 17917-17920.
- Purins, L., Van Den Bosch, L., Richardson, V. & Morona, R. (2008).** Coiled-coil regions play a role in the function of the *Shigella flexneri* O-antigen chain length regulator Wzz<sub>pHS2</sub>. *Microbiology* **154**, 1104-1116.
- Purvis, I. J., Bettany, A. J., Santiago, T. C., Coggins, J. R., Duncan, K., Eason, R. & Brown, A. J. (1987).** The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation in vivo. A hypothesis. *J Mol Biol* **193**, 413-417.
- Raetz, C. R. (1990).** Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* **59**, 129-170.
- Raetz, C. R. & Whitfield, C. (2002).** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**, 635-700.
- Rahn, A. & Whitfield, C. (2003).** Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Mol Microbiol* **47**, 1045-1060.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U. & other authors (1994).** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* **8**, 217-225.
- Rojas, G., Saldias, S., Bittner, M., Zaldivar, M. & Contreras, I. (2001).** The *rfaH* gene, which affects lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhi, is differentially expressed during the bacterial growth phase. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 123-128.
- Sakaguchi, T., Kohler, H., Gu, X., McCormick, B. A. & Reinecker, H. C. (2002).** *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 367-381.
- Saldias, M. S., Patel, K., Marolda, C. L., Bittner, M., Contreras, I. & Valvano, M. A. (2008).** Distinct functional domains of the *Salmonella enterica* WbaP transferase that is involved in the initiation reaction for synthesis of the O antigen subunit. *Microbiology* **154**, 440-453.

- Sandlin, R. C., Lampel, K. A., Keasler, S. P., Goldberg, M. B., Stolzer, A. L. & Maurelli, A. T. (1995).** Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infect Immun* **63**, 229-237.
- Sandlin, R. C., Goldberg, M. B. & Maurelli, A. T. (1996).** Effect of O side-chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol* **22**, 63-73.
- Sansonetti, P. J. (2001).** Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G319-323.
- Scott, D. C., Newton, S. M. & Klebba, P. E. (2002).** Surface loop motion in FepA. *J Bacteriol* **184**, 4906-4911.
- Schnaitman, C. A. & Klena, J. D. (1993).** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 655-682.
- Sharp, P. M. & Li, W. H. (1987).** The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **15**, 1281-1295.
- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S. L., Robinson, C. V., Ilag, L. L., von Heijne, G. & Daley, D. O. (2005).** Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Biol Chem* **280**, 34409-34419.
- Stevens, M. P., Clarke, B. R. & Roberts, I. S. (1997).** Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster by transcription antitermination. *Mol Microbiol* **24**, 1001-1012.
- Stevenson, G., Kessler, A. & Reeves, P. R. (1995).** A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiol Lett* **125**, 23-30.
- Svetlov, V., Belogurov, G. A., Shabrova, E., Vassilyev, D. G. & Artsimovitch, I. (2007).** Allosteric control of the RNA polymerase by the elongation factor RfaH. *Nucleic Acids Res* **35**, 5694-5705.
- Tang, K. H., Guo, H., Yi, W., Tsai, M. D. & Wang, P. G. (2007).** Investigation of the conformational states of Wzz and the Wzz-O-antigen complex under near-physiological conditions. *Biochemistry* **46**, 11744-11752.
- Thanaraj, T. A. & Argos, P. (1996).** Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein Sci* **5**, 1594-1612.
- Tocilj, A., Munger, C., Proteau, A. & other authors (2008).** Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 130-138.
- Toro, C. S., Farfan, M., Contreras, I., Flores, O., Navarro, N., Mora, G. C. & Prado, V. (2005).** Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* **133**, 81-86.
- Tsai, C. M. & Frasch, C. E. (1982).** A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**, 115-119.

- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L. (2001).** Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15264-15269.
- Valvano, M. A. (2003).** Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front Biosci* **8**, s452-471.
- Van den Bosch, L., Manning, P. A. & Morona, R. (1997).** Regulation of O-antigen chain length is required for *Shigella flexneri* virulence. *Mol Microbiol* **23**, 765-775.
- Van den Bosch, L. & Morona, R. (2003).** The actin-based motility defect of a *Shigella flexneri* *rmlD* rough LPS mutant is not due to loss of *IcsA* polarity. *Microb Pathog* **35**, 11-18.
- Varela, G., Schelotto, F., di Conza, J. & Ayala, J. A. (2001).** Analysis of the O-antigen chain length distribution during extracellular and intracellular growth of *Shigella flexneri*. *Microb Pathog* **31**, 21-27.
- Vines, E. D., Marolda, C. L., Balachandran, A. & Valvano, M. A. (2005).** Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *J Bacteriol* **187**, 3359-3368.
- Wasef, J. S., Keren, D. F. & Mailloux, J. L. (1989).** Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun* **57**, 858-863.
- Wei, J., Goldberg, M. B., Burland, V. & other authors (2003).** Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun* **71**, 2775-2786.
- Whitfield, C. (1995).** Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol* **3**, 178-185.
- Zhong, Q. P. (1999).** Pathogenic effects of Opolysaccharide from *Shigella flexneri* strain. *World J Gastroenterol* **5**, 245-248.