

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Identificación de genes comunes requeridos para la colonización sistémica de Salmonella enterica serovares Typhi, Typhimurium y Enteritidis mediante un análisis global de mutantes bajo selección negativa in vivo”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica en el área de especialización de Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:

CAMILA VALENZUELA MONTENEGRO

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Carlos Santiviago Cid
Dr. Sergio Álvarez Armijo

Santiago-Chile
MARZO 2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

CAMILA VALENZUELA MONTENEGRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización: Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Carlos Santiviago Cid

Co-director de Tesis:

Sergio Álvarez Armijo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch

Dr. Marcelo Kogan Bocian

Dr. Roberto Vidal Álvarez

Don't ever let your mind stop you from having a good time!
— Jason Mraz

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1110172 liderado por el Dr. Carlos Santiviago.

Como parte de esta tesis se realizó una pasantía en el laboratorio del Dr. Michael McClelland, financiada por la beca “Estadías cortas de investigación en el extranjero para tesis de doctorado y magíster de la Universidad de Chile” otorgada por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

Agradecimientos

Quiero agradecer a quienes fueron fundamentales en el desarrollo de esta Tesis, especialmente a:

Mi jefe, Cliff, por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, muchas gracias por las invaluable enseñanzas, el cariño, la confianza y los muchos consejos, tanto profesionales como personales. Muchas gracias por ser el mejor jefe que existe.

A mi otro jefe, Sergio, por su ayuda y la excelente disposición en estos años de trabajo, por la ayuda desenredando mis ideas, el cariño y los consejos.

A mi comisión evaluadora, al Dr. Marcelo Kogan, por instarme a mirar más allá de la microbiología en esta tesis, al Dr. Roberto Vidal, por todos los consejos y la sonrisa constante y especialmente a la Dra. Daniela Seelenfreund, por el apoyo, los consejos, la guía y por permitirme ser ayudante de Biología Molecular, por entregarme su confianza todos estos años.

Al Dr. Michael McClelland y toda la gente del VRISD, por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio donde realicé trabajo indispensable para esta tesis, por la increíble acogida.

A la Dra. Claudia Saavedra y a Francisco Ipinza, por la indispensable ayuda prestada en el trabajo con animales, en especial muchas gracias a Francisco por la gran disposición.

A la Dra. Inés Contreras, la Dop, por la confianza entregada. Le agradezco enormemente haberme abierto las puertas de su laboratorio para realizar mi primera Unidad de Investigación lo que me permitió integrarme al mejor grupo de trabajo imaginable.

A la profesora Mercedes Zaldívar, por el cariño, los datos históricos y prácticos, los libros, las recetas y el tiempo compartido.

A la Dra. Anilei Hoare, mi primera jefa en el laboratorio. Muchas gracias por el cariño y las enseñanzas que me introdujeron en el mundo de la microbiología.

A mis compañeros de laboratorio: a Blond por saber reír frente a todo, a Deivid por la ayuda con los ratones, los datos veterinarios y las muchas risas, a Lorenz y Berny por toda la ayuda y el cariño durante la carrera y estos años de tesis, a Robert por aportar más alegría al laboratorio y especialmente a Chechi, por toda la ayuda y cariño durante mi estadía en San Diego, no sé cómo lo habría logrado sin tu ayuda en esas latitudes. A mis niños de unidades de investigación: Alfonso, Ale y Rodrigo, muchas gracias por enseñarme a enseñar. A los miembros antiguos del lab Mara,

Pía, Denisse y Gato, por ser parte de la familia laboratorística. A los Chechenos Grillo y Cracra, por todas las risas.

A Luis, por su excelente disposición y ayuda en el trabajo de laboratorio y en los prácticos.

A Betsy, Daniel, Sandie, Jennifer, Rocío y a las demás personas que conocí en San Diego, gracias por hacer de mi estadía allí una aventura muy especial.

A mis adorados amigos de la carrera: Marce, Carlos, Anibal, Dasfne, Paulita, Bego y Feña, por haber recorrido juntos este camino, por ser los mejores bioquímicos en nuestra especial manera y por la vida fuera de la Universidad. A los más pequeños, Komal, Christofer mi ahijado, Martin y Claudia.

A Juan y Cony, por la amistad explosiva que tenemos y que solo crece con la distancia. Muchas gracias por mostrarme Chicago y sus mejores lugares.

A Cata, mi mayor apoyo. Por crecer conmigo durante estos años, la paciencia en todo sentido y por el cariño entregado.

A mi familia, mi enorme y variada familia. A mi mami, por ponernos siempre a mí y a mis hermanos primero, por ser la mejor mamá. A mi Pá, por las enseñanzas, el cariño y por ayudarme a crecer en todo sentido. A mis hermanos, en orden de aparición: Isa, Vicho, Gary y Fran, los adoro con todo mi corazón. A Fuffy por el cariño y por no dejar que la música fuera algo trivial en mi vida. A Claudí, por el cariño que no cambia sin importar la distancia y el tiempo. A Paulina, por ser una gran fuente de cariño estos últimos años y a Paloma y Valentina, por integrarse a la familia. A mis abuel@s, tí@s y prim@s, por el cariño de toda la vida. A mi familia gatuna: Moña, Chonsis, Legi, Negrita y Grisita, por el regaloneo y la capacidad de hacerme sonreír incluso en los días más negros.

A mis amigas de colegio, Nacha y Guby, por las juntas ocasionales y el nunca perder contacto.

Al Dr. Sergio Lobos, por las enseñanzas, el cariño y la increíble disposición en todo momento. Muchas gracias por permitirme ser su ayudante estos años.

A todos los personajes que conocí durante este camino, por hacer de mi vida un lugar siempre sorprendente.

A mis amores, Glinka, Sanosuke y Mateo, que vivirán siempre en mi corazón.

La presente tesis dio origen a las siguientes comunicaciones, premios y becas:

Presentaciones en Congresos Nacionales:

Valenzuela C., Silva, C. A., Porwollik, S., McClelland, M., Álvarez S.A. y Santiviago, C. A. Identificación global de genes de *Salmonella enterica* serovar Typhi requeridos para la colonización sistémica en un modelo murino de salmonelosis. XXXIII Congreso Chileno de Microbiología. 29 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2011. Olmué, Chile.

Valenzuela C. Identificación global de genes de *Salmonella enterica* serovar Typhi requeridos para la colonización sistémica en un modelo murino de salmonelosis. XXIX Congreso de Estudiantes de Bioquímica. 7 al 11 de Agosto, 2012. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Valenzuela C., Silva C. A., Miranda A., Castillo R. A., Alvéstegui A., Mardones P., Porwollik S., McClelland M., Contreras I., Álvarez S. A., Santiviago C. A. Identificación global de genes de *Salmonella enterica* serovar Typhi requeridos para la colonización sistémica. Congreso Ciencia joven 2012 con motivo del XV Aniversario del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 6 de Septiembre, 2012. Santiago, Chile.

Valenzuela C., Silva C. A., Miranda A., Castillo R. A., Alvéstegui A., Mardones P., Porwollik S., McClelland M., Contreras I., Álvarez S. A., Santiviago C. A. Identificación global de genes de *Salmonella enterica* serovar Typhi requeridos para la colonización sistémica. 4ta Feria de Postgrado y Postítulo, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 12 de Septiembre, 2012. Santiago, Chile.

Valenzuela C., Silva C. A., Miranda A., Castillo R. A., Alvéstegui A., Contreras I., Porwollik S., McClelland M., Álvarez S. A., Santiviago C. A. Análisis comparativo de los genes de *Salmonella enterica* serovares Typhi, Typhimurium y Enteritidis requeridos para la colonización sistémica de un hospedero murino. XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. 23 al 26 de Noviembre, 2012. Valdivia, Chile.

Presentaciones en Congresos Internacionales:

C. Valenzuela, C. A. Silva, S. A. Álvarez, I. Contreras, G. Mora, S. Porwollik, M. McClelland, C. A. Santiviago. Genome-wide identification of *S. Typhi* genes required for systemic colonization in a murine model of salmonellosis. 112th ASM General Meeting. 16 al 19 de Junio, 2012. San Francisco, California, USA.

Premios:

Primer lugar concurso de Tesistas XXIX Congreso de Estudiantes de Bioquímica. 7 al 11 de Agosto, 2012, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Becas:

“Estadías cortas de investigación en el extranjero para tesistas de doctorado y magíster de la Universidad de Chile”. Segunda Convocatoria 2011. Vicerrectoría de asuntos académicos del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Abreviaturas	V
Resumen	VI
Summary	VIII
1. Introducción	1
1.1 Factores de virulencia.....	4
1.2 Ciclo infectivo de <i>Salmonella</i>	6
1.3 Modelos animales de infección por <i>Salmonella</i>	8
1.4 Estudios genéticos en <i>Salmonella</i>	9
1.5 Diseño experimental.....	10
2. Hipótesis	15
3. Objetivo General	15
4. Objetivos Específicos	15
5. Materiales y Métodos	16
5.1 Reactivos.....	16
5.2 Cepas.....	18
5.3 Plasmidios.....	19
5.4 Partidores.....	20
5.5 Técnicas microbiológicas y genéticas.....	21
5.5.1 Selección de las cepas a utilizar.....	21
5.5.2 Medios de cultivo.....	21
5.5.3 Construcción de la genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i>	22
5.5.4 Análisis de fenotipos y genotipo de mutantes obtenidas al azar por inserción mediante el uso de transposones.....	24
5.5.4.1 <i>Detección de mutantes auxótrofas</i>	24
5.5.4.2 <i>Detección de mutantes con deficiencias en la producción del LPS</i>	25
5.5.4.3 <i>Detección del transposón por PCR</i>	27
5.5.4.4 <i>Detección del transposón por Southern blot</i>	28

5.5.5	Ensayos de colonización sistémica en ratones BALB/c utilizando la genoteca de mutantes.....	30
5.5.6	Hibridación de las muestras en <i>microarrays</i> genómicos.....	32
5.5.6.1	<i>Preparación de las muestras</i>	32
5.5.6.2	<i>Hibridación de microarrays</i>	35
5.5.7	Obtención de las mutantes dirigidas por el método de Red-swap.....	36
5.5.7.1	<i>Mutagénesis por intercambio alélico con productos de PCR</i>	36
5.5.7.2	<i>Verificación de las mutantes obtenidas</i>	38
5.5.8	Ensayos de competencia <i>in vivo</i> en el modelo murino de infección.....	38
6.	Resultados	40
6.1	Generación y validación de una genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i>	40
6.1.1	Construcción de una genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i>	40
6.1.2	Detección de mutantes auxótrofas.....	41
6.1.3	Detección de mutantes con deficiencias en la producción del LPS.....	42
6.1.4	Detección del transposón por PCR.....	44
6.1.5	Detección del número de inserciones por Southern blot.....	45
6.2	Ensayos de colonización sistémica en ratones BALB/c utilizando la genoteca de mutantes.....	46
6.3	Identificación global de mutantes de <i>S. Typhi</i> que presentan deficiencias en la colonización sistémica de ratones BALB/c.....	50
6.4	Análisis comparativo de mutantes bajo selección negativa en tres serovares de <i>Salmonella</i>	57
6.5	Mutantes del operón <i>tatABC</i> son atenuadas en los tres serovares.....	61
7.	Discusión	65
8.	Conclusiones	81
9.	Referencias	82
10.	Anexo	88

Índice de Tablas

Tabla 1	Cepas utilizadas en esta tesis.....	18
Tabla 2	Plasmidios utilizados en esta tesis.....	19
Tabla 3	Partidores utilizados en esta tesis.....	20
Tabla 4	Lista de genes comunes a <i>S. Typhi</i> , <i>S. Typhimurium</i> y <i>S. Enteritidis</i> , requeridos para la colonización sistémica de un hospedero murino.....	85

Índice de Figuras

Figura 1	Método de detección de mutantes bajo selección negativa <i>in vivo</i> mediante hibridaciones en <i>microarrays</i> genómicos.....	12
Figura 2	Presencia de mutantes con deficiencia en la producción del LPS en la genoteca.....	43
Figura 3	Detección del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en mutantes de <i>S. Typhi</i> mediante PCR.....	44
Figura 4	Detección de número de inserciones del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en mutantes de <i>S. Typhi</i> mediante Southern blot.....	45
Figura 5	Esquema general del protocolo utilizado para los ensayos de colonización sistémica de una genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i> STH2370.....	47
Figura 6	Colonización del hígado y bazo de ratones BALB/c por la genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i>	49
Figura 7	Colonización de ratones BALB/c por la genoteca de mutantes de <i>S. Typhi</i> en las muestras seleccionadas para realizar las hibridaciones en <i>microarrays</i>	50
Figura 8	Análisis global de mutantes de <i>S. Typhi</i> que presentan deficiencias en la colonización sistémica.....	51
Figura 9	Amplificación de la región adyacente a cada una de las inserciones presentes en muestras <i>input</i> y <i>output</i> de la genoteca de <i>S. Typhi</i>	52
Figura 10	Categorías funcionales de genes de <i>S. Typhi</i> bajo selección negativa <i>in vivo</i>	56
Figura 11	Genes bajo selección negativa en los tres serovares estudiados.....	59
Figura 12	Genes comunes a los tres serovares bajo selección negativa <i>in vivo</i> , agrupados según la categoría funcional a la que pertenecen.....	60
Figura 13	Ensayo de competencia <i>in vivo</i> entre la cepa silvestre de <i>S. Typhimurium</i> y mutantes <i>tatABC</i> y <i>aroA</i>	62
Figura 14	Ensayo de competencia <i>in vivo</i> entre la cepa silvestre de <i>S. Enteritidis</i> y mutantes <i>tatABC</i> y <i>aroA</i>	63
Figura 15	Ensayo de competencia <i>in vivo</i> entre la cepa silvestre de <i>S. Typhi</i> y mutantes <i>tatABC</i> y <i>aroA</i>	63
Figura 16	Modelo de ciclo de translocación del sistema Tat en <i>E. coli</i>	76
Figura 17	Comparación de las secuencias del péptido-sígnal de sustratos de los sistemas de secreción Tat y Sec.....	77

Abreviaturas

AL	agar Luria
Amp	ampicilina
Cam	cloranfenicol
CL	caldo Luria
csp	cantidad suficiente para
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
g	gramos
gDNA	DNA genómico
h	horas
IP	intraperitoneal
Kan	kanamicina
kb	kilobases
LPS	lipopolisacárido
L	litro
M	concentración molar
µg	microgramo
µL	microlitro
µm	micrometro
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pDNA	DNA plasmidial
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
SPI	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
STM	Signature-Tagged Mutagenesis
T3SS	Sistema de Secreción Tipo 3
Tmp	trimetoprim
ufc	unidades formadoras de colonias

Resumen

El género *Salmonella* comprende dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, que en conjunto agrupan a más de 2.500 serovares. De éstos, los pertenecientes a *S. enterica* subespecie *enterica* son responsables de aproximadamente el 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente. A nivel mundial se producen anualmente millones de casos de salmonelosis en el ser humano y miles de muertes, principalmente en países subdesarrollados.

En esta tesis se propuso identificar un conjunto de genes requeridos para la colonización sistémica de un hospedero murino por tres serovares de *Salmonella*: *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Este estudio se realizó mediante un análisis masivo de mutantes bajo selección negativa *in vivo*. La detección de aquellas mutantes con defectos en la colonización sistémica aguda de ratones BALB/c se realizó mediante hibridaciones comparativas utilizando un *microarray* genómico de *Salmonella*. El posterior análisis comparativo de las mutantes bajo selección negativa *in vivo* en los tres serovares, nos permitió identificar que mutantes en 131 genes serían atenuadas *in vivo*. Dentro de este grupo identificamos genes codificados en islas de patogenicidad conservadas del género *Salmonella*, genes necesarios para la biosíntesis de purinas y compuestos aromáticos (*aro*, *pur* y *gua*), genes relacionados con la biosíntesis y modificación del LPS (*rfa*, *rfb*) y genes que codifican reguladores globales asociados a patogenicidad (*phoP*, *envZ*, *rpoN*, *dam* y *rsd*). Otros genes identificados corresponden a los que

codifican el sistema transportador de proteínas *Twin-Arginine* (*tatABC*), genes que codifican las diferentes subunidades de una NADH deshidrogenasa (genes *nuo*); un locus que corresponde a un transportador de péptidos del tipo ABC (*sapBF*). También pudimos detectar que mutantes en genes involucrados en el transporte de solutos se encuentran bajo selección, como *trkH* que codifica un transportador de potasio.

El sistema de transporte *Twin-Arginine* corresponde a una de las dos vías de translocación de proteínas hacia el espacio periplasmático en bacterias Gram negativo. La participación de este sistema en la patogenicidad de *Salmonella* se confirmó mediante ensayos de competencia *in vivo* entre mutantes definidas del operón y la respectiva cepa silvestre en los tres serovares estudiados.

El análisis global de mutantes en tres serovares nos permitió determinar un conjunto de genes comunes necesarios para establecer la colonización sistémica aguda en un hospedero murino. Posteriormente, se confirmó la participación del sistema de transporte de proteínas Tat en la patogenicidad de *Salmonella*. Los resultados de los ensayos de competencia nos permitieron confirmar la predicción obtenida en el análisis de masivo de mutantes bajo selección negativa *in vivo*.

Summary

Identification of a common set of genes required for systemic colonization of *Salmonella enterica* serovares Typhi, Typhimurium and Enteritidis by a global analysis of mutants under negative selection in vivo

The *Salmonella* genus comprises two species: *S. bongori* and *S. enterica*, which can be grouped into more than 2,500 serotypes. Serovars within *S. enterica* subspecies *enterica* account for ~99% of all salmonellosis in warm-blooded animals. Worldwide, these organisms are responsible for hundreds of millions of salmonellosis cases and hundreds of thousands of deaths, mainly in underdeveloped countries.

In this thesis, we aimed to identify a group of genes required for systemic colonization of a murine host by three *Salmonella* serotypes: *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. We used a high-throughput microarray-based screening for mutants with defects in systemic colonization of BALB/c mice. Subsequent comparative analysis of mutants under negative selection *in vivo* allowed us to identify that mutants in 131 genes are attenuated in the three serotypes under study. Within this group we found genes encoded in some of the pathogenicity islands conserved in the *Salmonella* genus, genes required for biosynthesis of purines and aromatic compounds (*aro*, *pur* and *gua*), genes related to LPS biosynthesis (*rfa* and *rfb*) and genes encoding regulators previously associated with virulence (*phoP*, *envZ*, *rpoN*, *dam* and *rsd*). Other genes identified

are those encoding the Twin-Arginine transport system (*tatABC*), genes coding the different subunits of a NADH dehydrogenase (*nuo* genes) and a locus encoding an ABC peptide transporter (*sapBF*). We also identified that mutants in genes involved in solute transport (i.e: *trkH*, that encodes a potassium transporter) are under negative selection *in vivo*.

The Twin-Arginine transport system corresponds to one of the two pathways used by Gram-negative bacteria to translocate proteins to the periplasmic space. Participation of this system in *Salmonella* pathogenicity was confirmed in the three serotypes under study by means of *in vivo* competition assays between targeted mutants of the operon and the corresponding wild-type strains.

Overall, the global analysis of mutants under negative selection *in vivo* in three serotypes of *Salmonella* allowed us to identify a common group of genes required to establish acute systemic colonization of a murine host. We confirmed the participation of the Tat transport system in the pathogenicity of *Salmonella* using *in vivo* competition assays. These results further support the predictions obtained in our global analysis.

1. Introducción

El género *Salmonella* comprende dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, que en conjunto agrupan más de 2500 serovares definidos según las variaciones antigénicas del antígeno O (AgO), flagelo y cápsula. La especie *S. enterica* se divide a su vez en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Los serovares pertenecientes a *S. enterica* subespecie *enterica* son responsables de cerca del 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente (Popoff, 2001; Popoff et al., 2004). Los cuadros clínicos provocados por infecciones con los distintos serovares de *Salmonella* son altamente variables y abarcan desde una diarrea leve hasta una enfermedad sistémica severa y la muerte del hospedero.

A nivel mundial, los diferentes serovares de *Salmonella* provocan millones de casos de salmonelosis y miles de muertes todos los años (CDC, 2005), existiendo una mayor prevalencia en países subdesarrollados. Los grupos de mayor riesgo corresponden a niños menores de 5 años y pacientes inmunocomprometidos, que suelen desarrollar una salmonelosis sistémica, en muchos casos fatal. Adicionalmente, los serovares de *Salmonella* son capaces de infectar a otros hospederos animales, como aves de corral, ganado bovino, ovino y porcino. La infección de estos hospederos genera grandes pérdidas en las industrias de producción de alimentos cárneos y derivados (Sockett, 1991). Es importante hacer notar que el cuadro clínico que se presenta en el hospedero depende de varios

factores relacionados entre sí, como son el serovar con que se infectó, la virulencia de la cepa, la dosis infectiva, la especie hospedera, su edad y estado inmunológico (Mastroeni y Maskell, 2005).

Por otra parte, los distintos serovares de *S. enterica* tienen una gran variabilidad de hospederos. Los serovares denominados “generalistas” son aquellos capaces de infectar a un amplio rango de hospederos animales, incluyendo humanos. A este grupo pertenecen los serovares *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. En el lado opuesto se encuentran los serovares “especialistas”, así llamados por su capacidad de infectar un espectro muy limitado de hospederos. Entre estos serovares se encuentran *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que producen una enfermedad sistémica de manera exclusiva en humanos y pollos, respectivamente.

S. Typhimurium es un patógeno generalista capaz de infectar un gran número de hospederos, principalmente animales de sangre caliente. En el hombre produce un cuadro de diarrea, vómitos y náuseas, que generalmente es autolimitado en individuos inmunocompetentes. Esta enfermedad, conocida como gastroenteritis, corresponde a una diarrea inflamatoria típica caracterizada por una infiltración masiva de neutrófilos en el íleon distal y el colon (Raffatellu et al., 2006). En niños pequeños o pacientes inmunocomprometidos se puede desarrollar una colonización sistémica producto de la infección, con hepatomegalia, esplenomegalia y aumento de las enzimas hepáticas circulantes (Bar-Meir et al., 2005; Brent et al., 2006; Graham, 2002; Graham et al., 2000; Shimoni et al., 1999). En ratones en cambio,

S. Typhimurium causa una enfermedad similar a la fiebre tifoidea producida por el serovar *Typhi* en el hombre (ver adelante).

S. Enteritidis también es un serovar generalista que en el hombre produce un cuadro clínico de gastroenteritis caracterizado por diarrea, fiebre y dolor abdominal. Es importante destacar que *S. Enteritidis* es la principal causa de salmonelosis por ingestión de alimentos contaminados a nivel mundial (Guard-Petter, 2001; Parker et al., 2001). Este serovar es capaz de infectar aves de postura, provocando una infección asintomática con colonización de los oviductos del ave. De esta manera, la bacteria es capaz de colonizar los huevos antes de que se forme la cáscara, pasando inadvertida hasta que los huevos contaminados son ingeridos por los humanos.

Por su parte, *S. Typhi* es un patógeno estrictamente adaptado al ser humano, cuya transmisión se produce sólo de persona a persona por vía fecal-oral a través de alimentos o agua contaminados. Este serovar produce en el hombre una enfermedad sistémica severa conocida como fiebre tifoidea, la que se caracteriza por una colonización sistémica que incluye hígado, bazo, médula ósea, además del intestino, donde se produce una patología intestinal atípica caracterizada por infiltración de macrófagos y células dendríticas (Raffatellu et al., 2006). Las características más importantes de esta enfermedad corresponden a fiebre de hasta 40°C que persiste por 10 a 14 días, acompañada de fuerte cefalea, molestias abdominales y letargo (House et al., 2001).

1.1 Factores de virulencia

A la fecha se han descrito numerosos mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella*. La mayoría de estos mecanismos han sido estudiados en el serovar *S. Typhimurium* mediante el uso de modelos *in vivo* e *in vitro* (Galán y Curtiss III, 1989; Galán et al., 1992; Gulig y Doyle, 1993; Hensel et al., 1995), lo que ha permitido identificar numerosos genes requeridos para la virulencia de este serovar. Muchos de estos genes se encuentran codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) que se encuentran conservadas dentro del género, SPI-1 a SPI-5. Las islas de patogenicidad corresponden a fragmentos de DNA adquiridos generalmente por transmisión horizontal y que contribuyen de manera directa a la virulencia de la bacteria.

Las SPIs más ampliamente estudiadas son la SPI-1 y SPI-2, que codifican dos sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) independientes. Estos sistemas corresponden a grandes estructuras proteicas que permiten inyectar proteínas efectoras en células hospederas y se ha demostrado que son críticos en diferentes etapas de la infección. El T3SS codificado en la isla SPI-1 (T3SS_{SPI-1}) es necesario durante la fase intestinal de la infección, dado que ayuda a la invasión de células del epitelio intestinal mediante la inyección de proteínas efectoras que inducen la reorganización del citoesqueleto de la célula, lo que termina con la endocitosis de la bacteria por estas células fagocíticas (Hardt et al., 1998; Patel y Galan, 2006). Adicionalmente, la acción de este sistema induce una fuerte respuesta inflamatoria. Luego de cruzar la barrera epitelial, la bacteria utiliza nuevamente el T3SS_{SPI-1} para

ingresar en células fagocíticas residentes en el subepitelio. Una vez dentro de los macrófagos, se expresa y activa el segundo sistema de secreción, codificado en la isla SPI-2 (T3SS_{SPI-2}), que le permite a *Salmonella* intervenir la ruta endocítica, para generar la "vacuola contenedora de *Salmonella*" (SCV), compartimiento en el que la bacteria puede sobrevivir y replicarse (Cirillo et al., 1998; Hensel et al., 1998; Rappi et al., 2003; Waterman y Holden, 2003).

Otros factores de virulencia a destacar corresponden a transportadores de magnesio y otras proteínas de función desconocida a la fecha, codificados en la isla SPI-3. Los productos de estos genes son esenciales para la supervivencia de la bacteria dentro de los macrófagos (Blanc-Potard y Groisman, 1997; Blanc-Potard et al., 1999). La isla SPI-4 contiene genes que codifican un sistema de secreción de tipo 1 y su correspondiente proteína secretada (SiiE), que actúa como adhesina no fimbrial mediando el contacto con las células epiteliales (Gerlach et al., 2007; Wong et al., 1998). Los genes de esta isla son necesarios durante la fase intestinal de la infección. Por otra parte, SPI-5 contiene genes requeridos por *Salmonella* para producir gastroenteritis pero no para establecer una infección sistémica (Wood et al., 1998). Adicionalmente, genes que codifican proteínas relacionadas con la biosíntesis y modificación del lipopolisacárido (LPS) y la biosíntesis de purinas, son críticos para la virulencia de este patógeno (Hensel et al., 1995).

Las cinco islas de patogenicidad mencionadas anteriormente se encuentran en la mayoría de los serovares de *S. enterica* subespecie *enterica*, con pequeñas variaciones entre los distintos serovares que incluyen inversiones, deleciones e

inserciones de DNA (Amavisit et al., 2003; Ochman y Groisman, 1996). Si bien se han estudiado extensamente los genes codificados en islas de patogenicidad, un análisis a escala genómica permitirá descubrir otros genes, localizados en otras zonas del genoma, que también podrían ser importantes durante la infección sistémica aguda. No obstante, la presencia de estas cinco islas de patogenicidad denota importantes similitudes en los mecanismos de colonización de hospedero entre los distintos serovares de *Salmonella*.

1.2 Ciclo infectivo de Salmonella

Es importante mencionar que, para infectar sus respectivos hospederos, los tres serovares mencionados anteriormente (*S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*) realizan un ciclo infectivo similar. Las bacterias, luego de ser ingeridas sobreviven al pH ácido del estómago y llegan hasta el íleon distal, donde son capaces de invadir las células epiteliales del intestino por la cara apical utilizando los mecanismos descritos anteriormente. Al llegar al subepitelio, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos residentes, donde mediante la activación del T3SS_{SPI-2}, y dependiendo del hospedero, son capaces de interrumpir la vía endocítica para impedir la fusión de la SCV con el lisosoma, lo que les permite sobrevivir y replicarse dentro del macrófago (Mastroeni y Maskell, 2005). Hasta este punto, los mecanismos de patogenicidad empleados por los tres serovares son conservados y en los procesos posteriores se hacen presentes las diferencias entre ellos. Por ejemplo, *S. Typhi* es capaz de viajar dentro de los macrófagos humanos utilizando el sistema retículo endotelial, lo que le permite pasar a la circulación

sistémica alcanzando órganos internos, desde donde posteriormente es capaz de volver al intestino para ser excretada e infectar a su próximo hospedero. En humanos, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* provocan una infección localizada en el íleon y el colon, desde donde puede ser excretada al ambiente para infectar a un nuevo hospedero. En individuos inmunocomprometidos sin embargo, éstas pueden pasar a la circulación sistémica.

A la fecha se cuenta con la secuencia de los genomas completos de muchos serovares, entre los que se cuentan *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Paratyphi A*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Mediante análisis comparativos de estas secuencias se ha demostrado que cerca del 80% de los genes son conservados entre los distintos serovares, compartiendo un 97% de identidad a nivel de secuencia. Sólo el 20% restante del genoma (que corresponde a aproximadamente 880 genes) es único para cada serovar (Bäumler et al., 1994; Edwards et al., 2002). Como se explicó anteriormente, existen numerosos mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* que son comunes durante la colonización de un hospedero. Por lo tanto, es razonable pensar que existe un conjunto de genes (codificados en el 80% del genoma conservado entre los distintos serovares) que sería el responsable de gran parte de los mecanismos de patogenicidad de esta especie bacteriana, de manera independiente de la especificidad de hospedero.

1.3 Modelos animales de infección por *Salmonella*

Los ratones son hospederos naturales de *Salmonella* y potenciales fuentes de infección para el hombre. Actualmente, existen numerosos modelos murinos de salmonelosis que permiten estudiar distintos aspectos de la infección por esta bacteria. En general, el modelo de estudio preferido es el de ratones susceptibles a *Salmonella*, que en su mayoría son cepas que presentan una mutación en el gen que codifica la proteína Nramp1. Esta proteína corresponde a un transportador de cationes divalentes acoplado a protones que es específico de las vesículas endocíticas de los macrófagos. Este transportador remueve iones como Fe^{2+} y Mg^{2+} desde la SCV, lo que restringe la replicación intracelular de la bacteria (Haraga et al., 2008). Los animales que presentan mutaciones en este gen, como los ratones BALB/c, son susceptibles a la infección por *Salmonella* y por otras bacterias intracelulares. En estos ratones, *Salmonella* causa una infección sistémica con colonización de órganos internos (bazo e hígado), alta carga bacteriana en las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos, observándose una distribución sistémica similar a la de pacientes con fiebre tifoidea y pacientes inmunodeprimidos que presentan infección por *S. Typhimurium* (Andrews-Polymenis et al., 2004; Bogomolnaya et al., 2008; Shimoni et al., 1999). Estas características convierten a estos ratones en un modelo adecuado para estudiar la infección sistémica aguda por *Salmonella*.

1.4 Estudios genéticos en *Salmonella*

En los últimos 30 años, la gran mayoría de los estudios genéticos en *Salmonella* se realizaron utilizando mutantes por inserción al azar de transposones, un tipo de análisis que resulta muy laborioso pero que permitió identificar importantes factores de virulencia, como los codificados en las islas SPI-1 y SPI-2 (Galán y Curtiss III, 1989; Hensel et al., 1995). La introducción de la “*Signature-Tagged Mutagenesis*” (STM), metodología que combina las ventajas de la mutagénesis por transposición y la selección negativa *in vivo*, permitió analizar por primera vez un conjunto de mutantes de manera simultánea. La STM está basada en la introducción de secuencias únicas contenidas en un transposón, lo que permite identificar mutantes individuales durante la infección de un hospedero animal (Hensel et al., 1995). Esta estrategia experimental ha sido ampliamente utilizada para identificar genes involucrados en la colonización de hospederos animales. Sin embargo, sigue siendo un método laborioso y que permite analizar sólo una pequeña fracción del genoma, pudiéndose estudiar unos pocos cientos de mutantes de manera simultánea. Para aumentar el rendimiento de los análisis de mutantes, se han desarrollado nuevos métodos que reemplazan los transposones marcados internamente por transposones que contienen promotores orientados hacia uno de sus extremos. Esto permite generar transcritos únicos para cada mutante, los que pueden ser monitoreados mediante hibridaciones en *microarrays* genómicos. Actualmente, se utilizan transposones que contienen los promotores T7 o SP6 orientados hacia el exterior, lo que permite generar transcritos marcados que pueden hibridar con *microarrays* genómicos (Lawley et al., 2006). Un análisis

posterior de datos utilizando nuevas herramientas bioinformáticas, permite mapear las inserciones presentes en la genoteca y comparar las poblaciones en dos situaciones distintas. Este tipo de análisis permite comparar la diferencia entre la población inoculada con aquella recuperada luego de un proceso de selección negativa *in vivo* en un hospedero animal.

1.5 Diseño experimental

En esta tesis se propuso en una primera fase identificar de manera global los genes requeridos por los tres serovares en estudio para colonizar un hospedero murino, utilizando genotecas de mutantes generadas por inserción al azar de un transposón. Posteriormente, se generaron mutantes dirigidas, utilizando un sistema de mutagénesis basado en el método de intercambio alélico mediante recombinación de productos de PCR (Datsenko y Wanner, 2000), las que se utilizaron para comprobar los fenotipos de alguna de las mutantes de esta genoteca que presentaron defectos en la colonización de órganos internos (bazo e hígado).

La estrategia experimental propuesta se basa en el siguiente razonamiento: cuando una población bacteriana que posee inserciones al azar de un transposón (genoteca de transposones) es sometida a un proceso de selección, las mutantes en aquellos genes requeridos para sobrevivir en este ambiente selectivo son incapaces de hacerlo y se pierden de la población. Estos cambios en la población de mutantes pueden ser monitoreados y cuantificados mediante la comparación entre la muestra inoculada o "*input*" y la muestra de salida o "*output*" que se obtiene

luego de un proceso de selección, en este caso la colonización de un hospedero murino.

Para monitorear los cambios en la población de mutantes se puede amplificar la región adyacente al sitio en que se insertó el transposón. Dado que el transposón a utilizar posee el promotor del fago T7 en uno de sus extremos, se pueden generar transcritos del gen en el cual se insertó este elemento y a partir de éstos sintetizar el cDNA, el que se puede marcar diferencialmente para las muestras *input* y *output* y detectar por hibridación en un *microarray*.

Experimentalmente, se inyecta una alícuota representativa de la genoteca de transposones en ratones BALB/c, guardando una muestra de la población inyectada (muestra *input*). Luego de un tiempo definido de infección, se recuperan las mutantes presentes en el hígado y el bazo de los ratones infectados (muestras *output*), dado que estos órganos son los principales blancos de colonización sistémica de *Salmonella*. Se utiliza entonces el DNA genómico de ambas muestras para obtener transcritos *in vitro* que representan cada uno de los genes en los que se insertó el transposón. Estos transcritos pueden ser marcados de manera diferencial con fluoróforos, como se ilustra en la **Figura 1**. Se identifican entonces las mutantes que hayan sufrido selección negativa *in vivo*, al comparar la intensidad de la fluorescencia proveniente de los transcritos marcados de las muestras *input* y *output* mediante hibridaciones usando un *microarray* genómico.

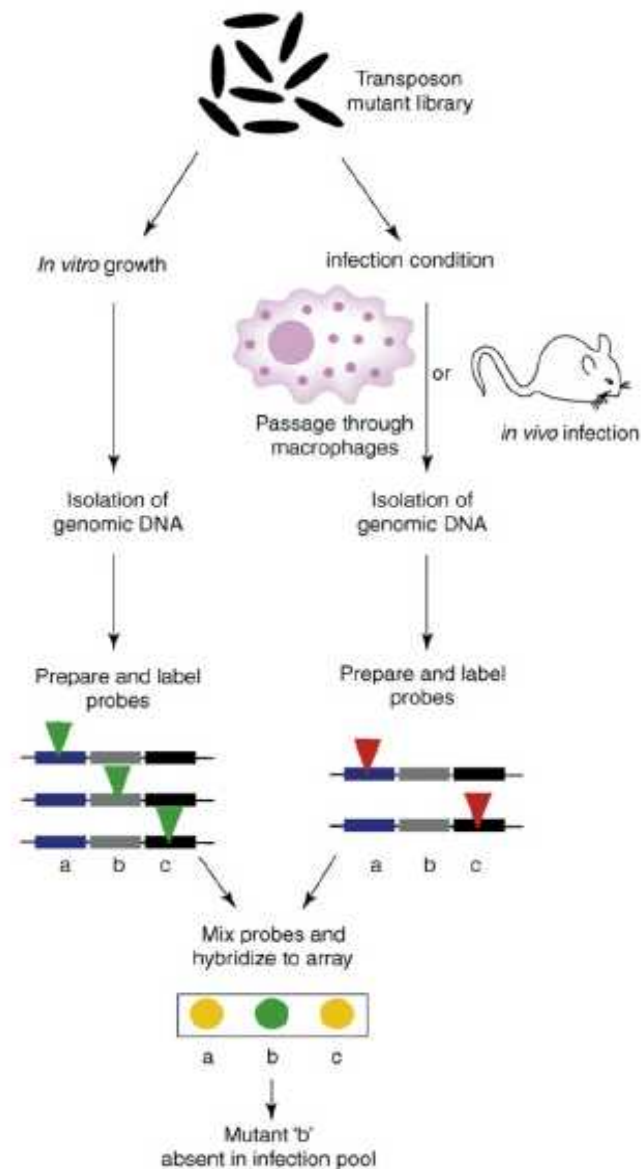


Figura 1 - Método de detección de mutantes bajo selección negativa in vivo mediante hibridaciones en microarrays genómicos. Poblaciones de mutantes por inserción de transposón se someten a ambientes selectivos, tales como el crecimiento en macrófagos o persistencia de la infección en un animal. Se aísla DNA genómico a partir de la muestra inicial y de la recuperadas de la condición selectiva. Posteriormente, se preparan sondas marcadas con fluoróforos, correspondientes a las regiones genómicas que flanquean el sitio de inserción del transposón en cada mutante presente en las muestras. Ambas sondas son hibridadas de manera competitiva en un *microarray* genómico, para evaluar la presencia relativa de las mutantes en cada muestra analizada. Adaptado de Burrack & Higgins, 2007.

Es importante recalcar que, dada la naturaleza polar de las mutaciones generadas por la inserción de un transposón, es necesario comprobar los fenotipos de al menos algunas las mutantes encontradas en el análisis de *microarray*. Para esto, se utiliza un método de mutagénesis dirigida y se realizan ensayos de competencia *in vivo* de estas mutantes *versus* la cepa silvestre, lo que permite comprobar que dichas mutantes realmente presentan un defecto en la colonización sistémica.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los mecanismos de patogenicidad descritos para *Salmonella* han sido estudiados en el serovar *S. Typhimurium*, mientras que se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en la patogenicidad de los serovares *S. Enteritidis* y *S. Typhi*. Este análisis comparativo de un serovar especialista y dos generalistas nos permitirá identificar un conjunto de genes comunes requeridos para la colonización sistémica, contribuyendo enormemente al conocimiento de los mecanismos moleculares de patogenicidad de esta bacteria.

Actualmente, en el laboratorio contamos con los datos de selección negativa *in vivo* de genotecas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* obtenidos a partir de un análisis similar al descrito. Considerando estos antecedentes, en esta tesis se propone construir una genoteca en *S. Typhi* y utilizarla para realizar la selección negativa *in vivo* en ratones BALB/c e identificar aquellas mutantes que presenten deficiencias en la colonización. Posteriormente, se compararán estos datos con los obtenidos para los serovares *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. A partir de estos tres

grupos de datos se buscará identificar un conjunto de genes comunes requeridos para la colonización del hospedero murino. A fin de verificar algunas de las observaciones obtenidas durante el análisis global, se generarán mutantes por delección, en los tres serovares en estudio, en uno de los genes o regiones génicas identificadas. Se evaluará la capacidad de colonización sistémica de estas mutantes, mediante ensayos de competencia *in vivo versus* la correspondiente cepa silvestre.

2. Hipótesis

“Existe un conjunto común de genes requerido por *Salmonella enterica* serovares Typhi, Typhimurium y Enteritidis para la colonización sistémica de un hospedero murino”

3. Objetivo general

Identificar un conjunto común de genes requeridos por *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* para la colonización de sistémica de un hospedero murino.

4. Objetivos específicos

1 - Identificar de manera global las mutantes de *S. Typhi* STH2370 que presenten deficiencias en la colonización sistémica de ratones BALB/c.

Generar una genoteca de transposones y realizar ensayos de colonización sistémica en ratones BALB/c para posteriormente identificar las mutantes de *S. Typhi* que se pierden bajo selección *in vivo*, mediante hibridaciones competitivas en un *microarray* genómico.

2 - Identificar un grupo de genes comunes requeridos para la colonización sistémica de ratones BALB/c por los serovares Typhi, Typhimurium y Enteritidis.

Comparar los datos de selección negativa *in vivo* obtenidos de la genoteca de transposones de *S. Typhi* STH2370 con los datos obtenidos por nuestro laboratorio usando genotecas de transposones de *S. Enteritidis* NCTC13349 y *S. Typhimurium* 14028s.

3 - Confirmar la participación de al menos uno de los genes comunes identificados en los tres serovares en la colonización sistémica de ratones BALB/c.

Generar mutantes definidas de los genes a estudiar, mediante el método de intercambio alélico descrito por Datsenko y Wanner, para luego realizar ensayos de competencia *in vivo* de las mutantes *versus* la cepa silvestre correspondiente.

5. Materiales y Métodos

5.1 Reactivos

De Amersham Biosciences, GE Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU) se obtuvo: Cy3-UTP y Cy5-UTP.

De Biotium (Londres, Inglaterra) se obtuvo: agarosa.

De Biotium Inc. (Hayward, CA, EEUU) se obtuvo: GelRed.

De Epicentre, Illumina Inc. (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: sistema comercial para transposición *in vitro* "EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> Promoter Insertion Kit" y sistema comercial para transcripción *in vitro* "AmpliScribe T7 Transcription Kit".

De Integrated DNA Technologies, IDT (Coralville, IA, EEUU) se obtuvo: partidores KAN2 F, KAN2 R, SEN3768_(H1+P1), SEN3770_(H2+P2), K1, SEN3768_Out5, SEN3770_Out3, CCT24VN, KAN2FP1-B y DOPR2.

De Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: DNA polimerasa Taq, transcriptasa reversa Superscript II.

De KPL (Gaithersburg, MD, EEUU) se obtuvo: kit para marcación de sondas para southern blot "PCR DNA Biotinylation" y kit para detección "HRP Southern Blotting".

De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvo: triptona, extracto de levadura, agar-agar, cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato de sodio, glucosa, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, glicerol, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, peryodato de sodio, hidróxido de sodio, amoníaco, nitrato de plata, ácido bórico, formaldehído, etanol absoluto, fosfato monoácido de potasio trihidratado, ortofosfato de sodio y amonio tetrahidratado y filtros Millipore de 0,025 µm.

De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) se obtuvo: 100 bp DNA ladder, 1 Kb DNA ladder, EcoRI y Transferasa Terminal.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: DNA polimerasa GoTaq, dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

De QIAGEN (Valencia, CA, EEUU) se obtuvo: sistema comercial para purificación de productos de PCR “QIAquick PCR purification kit” y columnas para purificación de RNA “RNeasy Mini Kit”.

De Roche Inc. (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: *microarrays* Nimblegen MMCCSAL06_Ty2, Nimblegen Hybridization kit LS.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, L-arabinosa, proteinasa K, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), mucina tipo II de estómago de porcino, kit de extracción de DNA genómico “GenElute Bacterial Genomic DNA”.

De Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: buffer PBS.

5.2 Cepas

Las cepas bacterianas usadas durante el desarrollo de esta Tesis se señalan en la **Tabla 1**.

Tabla 1 – Cepas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Fuente o referencia
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi		
S. Typhi STH2370	cepa silvestre	Stock del laboratorio
S. Typhi STH2370 <i>tatABC</i>	<i>tatABC</i> ::Cam (Cam ^R)	Este trabajo
S. Typhi STH2370 <i>aroA</i>	<i>aroA</i> ::Kan (Kan ^R)	Este trabajo
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
S. Typhimurium 14028s	cepa silvestre	Stock del laboratorio
S. Typhimurium 14028s <i>tatABC</i>	<i>tatABC</i> ::Kan (Kan ^R)	Este trabajo
S. Typhimurium 14028s <i>aroA</i>	<i>aroA</i> ::DHFR (Tmp ^R)	Stock del laboratorio
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis		
S. Enteritidis NCTC13349	cepa silvestre	Stock del laboratorio
S. Enteritidis NCTC13349 <i>tatABC</i>	<i>tatABC</i> ::Cam (Cam ^R)	Este trabajo
S. Enteritidis NCTC13349 <i>aroA</i>	<i>aroA</i> ::Kan (Kan ^R)	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
BW25113/pKD46	(<i>araD-araB</i>)567 <i>lacZ</i> 4787 <i>lacI</i> p-4000(<i>lacI</i> Q) - <i>poS</i> 396(Am) <i>rph</i> -1 (<i>rhaD-rhaB</i>) 568 <i>rrnB</i> -3 <i>hsdR</i> 514 / pKD46. Cepa portadora del plasmidio pKD46	Stock del laboratorio

DH5	<i>pir/pCLF1</i>	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 pir / pCLF1</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF1	Stock del laboratorio
DH5	<i>pir/pCLF2</i>	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 pir / pCLF2</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF2	Stock del laboratorio
DH5	<i>pir/pCLF4</i>	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 pir / pCLF4</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF4	Stock del laboratorio

5.3 Plasmidios

Los plasmidios usados durante el desarrollo de esta Tesis se señalan en la

Tabla 2.

Tabla 2 – Plasmidios utilizados en esta tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o Referencia
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> oriRpSC101(TS), AmpR (GenBank AY048746)	Datsenko & Wanner, 2000
pCLF1	<i>bla</i> FRT <i>dhfr</i> FRT PS1 PS2 oriR6K, AmpR, TmpR, promotor T7 (GenBank HM047090)	Stock del Laboratorio
pCLF2	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 oriR6K, AmpR, CamR, promotor T7 (GenBank HM047089)	Stock del Laboratorio
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 oriR6K, AmpR, KanR, promotor T7(GenBank EU629214)	Santiviago, 2009

5.4 Partidores

Los partidores usados durante el desarrollo de esta Tesis se señalan en la

Tabla 3.

Tabla 3 – Partidores utilizados en esta tesis.

Partidor	Secuencia
KAN-2(F)	ATGAGCCATATTCAACGGGAAA
KAN-2(R)	CGAGCATCAAATGAAACTGCAA
CCT24VN	CCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
DOPR2	CAACGCAGACCGTTCCGTGGCA
KAN2FP1-B	GTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC
SEN3768_(H1+P1)	AGGAACATGTATGGGTGGTATCAGTATTTGGCAGTTGTTGGTGCAGGCTGG <u>AGCTGCTTC</u>
SEN3770_(H2+P2)	GCGGTTGTGTTTAGTCTTCAGTGTGCTCGGCCTTTTCGGT <u>CATATGAATATC</u> <u>CTCCTTAG</u>
SEN3768_Out5	GAGCGGGTCATTCTTACTCG
SEN3770_Out3	TTCGTTCCGGTCAGTAGCAT
aroA_Out5	GCGCGCCTCTATCTATAACG
aroA_Out3	TTTTTCATACTAATCTTCCGTTGA
aroA_(H1+P1)	GTTGAGTTTCATGGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCGGTGCAGGCTGG <u>AGCTGCTTC</u>
aroA_(H2+P2)	AACAGAAGACTTAGGCAGGCGTACTCATTTCGCGCCAGTTGCATATGAATATC <u>CTCCTTAG</u>

Las secuencias subrayadas corresponden a aquellas que hibridan con las regiones P1 y P2 de los plasmidios pCLF1, pCLF2 y pCLF4.

5.5 Técnicas microbiológicas y genéticas

5.5.1 Selección de las cepas a utilizar

Se utilizó la cepa virulenta *S. Typhi* STH2370, que corresponde a un aislado clínico chileno para el cual existen estudios previos de nuestro laboratorio (Bueno et al., 2004). Mediante pruebas serológicas, se confirmó la producción y exportación del antígeno Vi en esta cepa. Además, mediante el cultivo en medio mínimo E en presencia y ausencia de cisteína y triptófano se confirmó que esta cepa es auxótrofa para ambos aminoácidos, tal como está descrito en la literatura para cepas de este serovar.

Por otra parte, se utilizaron las cepas *S. Typhimurium* 14028s y *S. Enteritidis* NCTC13349 ya que ambas infectan eficientemente ratones BALB/c y sus genomas se encuentran secuenciados (Jarvik et al., 2010; Thomson et al., 2008).

5.5.2 Medios de cultivo

Las bacterias se cultivaron rutinariamente de manera aeróbica en caldo Luria-Bertani (CL) (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) a 37°C. Cuando se requirió, el medio CL se suplementó con los antibióticos kanamicina (Kan, 50 µg/mL), ampicilina (Amp, 100 µg/mL), cloranfenicol (Cam, 20 µg/mL) o trimetoprim (Tmp, 100 µg/mL). Para los cultivos en medio definido se usó medio mínimo E (MgSO₄·7H₂O 0,2 g/L, ácido cítrico monohidratado 2 g/L, K₂HPO₄·3H₂O

13,1 g/L, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3,3 g/L), suplementado con glucosa (0,2 %), cisteína (0,3 mM) y triptofano (0,1 mM). Para los cultivos en medio sólido, los medios ya descritos se suplementaron con agar (15 g/L).

5.5.3 Construcción de la genoteca de mutantes de *S. Typhi*

Para la construcción de la genoteca de mutantes se utilizó el transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2>. Las bacterias se cultivaron a 37°C en CL con agitación, hasta una densidad óptica (DO_{600}) de 0,5 a partir de la dilución 1:50 de un cultivo crecido toda la noche. Para preparar las bacterias electrocompetentes se centrifugaron 50 mL del cultivo a 6.000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 30 mL de glicerol 15%, estéril y frío. Se centrifugó nuevamente y se repitió 3 veces el procedimiento de lavado. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 500 μL de glicerol 15%, estéril y frío.

Paralelamente, el transposón se incubó con la enzima transposasa del Tn5 durante 1 h a 37°C con el fin de generar transposomas *in vitro*, usando el sistema comercial EZ-Tn5<T7/KAN-2> *Promoter Insertion Kit* (Epicentre) según el protocolo indicado a continuación:

Transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> 0,1 pmol/ μL	2 μL
Transposasa Tn5 purificada 1 U/ μL	2 μL
Glicerol 87%	2 μL
<hr/>	
Volumen final	6 μL

Una alícuota de 3 μ L de transposomas se dializó sobre filtros Millipore de nitrocelulosa con poros de 0,025 μ m, contra agua destilada estéril durante 15 min y se electroporó en las bacterias competentes utilizando un electroporador *E. coli Pulser* (BioRad) a un voltaje de 1,8 kV en cubetas con 0,1 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después de electroporar, se agregó 1 mL de CL y se incubó a 37°C durante 1 h. Las mutantes se seleccionaron en placas de agar Luria (AL) suplementado con Kan (50 μ g/mL) (AL+Kan), incubando toda la noche a 37°C. Luego de cuatro rondas de mutagénesis, se recuperaron todas las colonias obtenidas, las que se resuspendieron y lavaron en PBS estéril y se sedimentaron mediante centrifugación. Finalmente, el sedimento se resuspendió en CL suplementado con glicerol (20%). La suspensión obtenida se dividió en alícuotas de 1 mL, las que se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso posterior.

5.5.4 Análisis de fenotipos y genotipo de mutantes obtenidas al azar por inserción mediante el uso de transposones

A fin de validar la genoteca construida, se escogieron mutantes individuales de manera aleatoria para realizar diversos experimentos que dieran cuenta de una inserción al azar del transposón durante la mutagénesis. Esta validación incluyó:

1. Detección de mutantes incapaces de crecer en medio mínimo (mutantes auxótrofas).
2. Detección de mutantes que presenten deficiencias en la producción del lipopolisacárido (LPS).
3. Detección del transposón por PCR.
4. Detección del transposón por Southern blot para determinar el número de inserciones obtenidas por mutante.

5.5.4.1 Detección de mutantes auxótrofas

Se seleccionaron 426 colonias al azar a partir de las mutantes obtenidas durante la mutagénesis. Estas mutantes fueron cultivadas de manera paralela en placas de medio rico (AL) y placas de medio mínimo E suplementado con glucosa, cisteína y triptofano (medio EGCT), descrito anteriormente. Se definieron como mutantes auxótrofas a aquellas mutantes que fueran capaces de crecer en medio rico pero no en medio EGCT.

5.5.4.2 Detección de mutantes con deficiencias en la producción del LPS

Preparación de muestras

En primer lugar, se realizó una búsqueda de colonias que tuvieran un fenotipo rugoso a simple vista. Estas mutantes fueron aisladas individualmente y se les realizó una extracción de LPS. Para esto, las bacterias se cultivaron a 37°C con agitación toda la noche en CL. Se tomó una alícuota de 1,5 mL de cultivo, se centrifugó a 10.000 x g durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 1 mL de CL fresco. Se midió la DO₆₀₀ de esta suspensión bacteriana y se tomó un volumen equivalente a 1,5 mL de bacterias ajustadas a una DO₆₀₀ de 2,0, según la siguiente fórmula:

$$V = \frac{2,0 \cdot 1,5 \text{ mL}}{DO_{600nm}}$$

El volumen utilizado se centrifugó a 10.000 x g durante 2 min y el sedimento se resuspendió en 90 µL de tampón de lisis (2% SDS, 4% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y 0,002% azul de bromofenol en Tris 1 M pH 6,8) y se hirvió durante 10 min. Finalmente, a cada lisado se le agregó 10 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 60°C durante 2 h. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su posterior uso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de las muestras de LPS se realizó en cámaras mini-Protean III (BioRad). Se prepararon geles desnaturantes de poliacrilamida según el siguiente protocolo: para el gel resolutivo se mezclaron 1.252 μL de solución de 49,5% acrilamida total / 6% bisacrilamida, 1.660 μL de Gel buffer (Tris-HCl 3,0 M pH 8,45 y SDS 0,3%), 520 μL de glicerol, 1.558 μL de H_2O destilada, 100 μL de APS 10% y 6 μL de TEMED. Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con ~200 μL de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador, que se preparó mezclando 250 μL de solución 49,5% acrilamida total / 3% bisacrilamida, 775 μL de Gel buffer, 2.100 μL de H_2O destilada, 75 μL de APS 10% y 6 μL de TEMED. 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) y se cargaron 3 μL de cada muestra de LPS por carril. La electroforesis de las muestras se realizó durante 50 min a 50 V, hasta que las muestras pasaran al gel resolutivo y luego durante 90 min a 150 V.

Tinción con plata

Para la detección del LPS en los geles se realizó una tinción con plata. El gel se fijó en una solución con 40% etanol y 5% ácido acético durante 12-16 h. Posteriormente, se oxidó durante 10 min utilizando una solución que contenía 40% etanol, 5% ácido acético y 0,7% ácido periódico. Se lavó 3 veces con agua destilada

y se procedió a teñir durante 15 min utilizando 150 mL de una solución que contenía 1 g de nitrato de plata, 2,8 mL de hidróxido de sodio y 2 mL de amoniaco 25%. Se lavó nuevamente y se reveló utilizando 250 mL una solución que contenía 12,5 mg de ácido cítrico monohidratado y 125 µL de formaldehido 37% hasta obtener la coloración deseada. Finalmente, la reacción se detuvo con al menos 3 lavados con agua destilada.

5.5.4.3 Detección del transposón por PCR

En mutantes seleccionadas al azar se realizó la detección del transposón por PCR, utilizando como templado DNA genómico (gDNA) obtenido de cada una de ellas. Para la detección se realizó el siguiente protocolo:

gDNA	2 µL			
Partidor Kan2 F (10 µM)	0,4 µL	94°C	3 min	
Partidor Kan2 R (10 µM)	0,4 µL	94°C	50 seg	30 ciclos
50X dNTPs (10 mM cada uno)	0,4 µL	55°C	30 seg	
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µL	72°C	1 min 30 seg	
5X <i>GoTaq</i> Buffer	4 µL	72°C	10 min	
<i>GoTaq</i> (Promega, 5U/µL)	0,2 µL	4°C		
H ₂ O libre de nucleasas	11 µL			
Volumen final	20 µL			

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% en buffer TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM y EDTA 1mM, pH 8,0) durante 40 min a 80 V.

5.5.4.4 Detección del transposón por Southern blot

Para determinar el número de inserciones en mutantes seleccionadas al azar, se realizó un Southern blot. Para esto, el gDNA de 18 mutantes más el de la cepa silvestre, se digirió con la enzima *EcoRI* como se indica en el protocolo a continuación:

H ₂ O libre de nucleasas	11 µL
Buffer 10X	2 µL
DNA	5 µL
<i>EcoRI</i> (NEB, 20 U/µL)	2 µL
<hr/>	
Volumen final	20 µL

Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche y resueltas mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% en buffer TAE 1X durante 3 h y 20 min a 25 V.

Se utilizó como sonda el producto de PCR correspondiente al cassette de resistencia a kanamicina amplificado a partir de una mutante seleccionada al azar. Esta sonda se marcó por incorporación de dCTP unido a biotina, utilizando el sistema comercial *Detector PCR DNA Biotinylation Kit* (KPL) según el siguiente protocolo:

10X Labeling mix	5 μ L
5X PCR buffer	10 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ L
Partidor Kan2 F (10 μ M)	1 μ L
Partidor Kan2 R (10 μ M)	1 μ L
gDNA	1 μ L
Taq (Invitrogen 5 U/ μ L)	0,3 μ L
<u>H₂O libre de nucleasas</u>	<u>30,2 μL</u>
Volumen final	50 μ L

94°C	3 min	30 ciclos
94°C	50 seg	
55°C	30 seg	
72°C	1 min 30 seg	
72°C	10 min	
4°C		

Previo al momento de utilizar la sonda, ésta se desnaturaló a 95°C durante 5 min y se transfirió inmediatamente a un baño de hielo.

Una vez visualizadas las muestras de gDNA digeridas en el gel, se realizó la transferencia y detección utilizando el sistema comercial *DNA Detector HRP Chemiluminescent Blotting Kit* (KPL). En primer lugar, se despurinó el DNA incubando el gel en HCl 0,25 N durante 10 min a temperatura ambiente. El gel se lavó para eliminar el exceso de ácido y luego se desnaturaló el DNA en NaOH 0,5 N / NaCl 1,5 M durante 30 min. Se realizó la transferencia del DNA en el gel a una membrana de nylon *Biodyne A* (Pall), utilizando como buffer de transferencia SSC 5X / NaOH 10mM e incubando toda la noche a temperatura ambiente. Luego de la transferencia, se lavó la membrana en buffer SSC 5X y se procedió a realizar el entrecruzamiento del DNA utilizando un transiluminador UV durante 2 min.

Se realizó la prehibridación de la membrana en buffer de hibridación con formamida durante 1 h a 42°C. Posteriormente, se añadió la sonda previamente marcada y desnaturalada y se hibridó durante toda la noche a 42°C. Luego, la membrana se lavó para eliminar la formamida y se procedió a la detección. Para esto, primero se bloqueó la membrana en solución de bloqueo, luego se incubó con la enzima peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina (HRP-SA) durante 20 min, se lavó y se incubó con el sustrato quimioluminiscente *LumiGLO*. Finalmente, la membrana se puso en contacto toda la noche con un film fotográfico *CL-XPosure Film* (Thermo Scientific) utilizando un *cassette* de exposición. La película fotográfica se reveló utilizando los protocolos estándar.

5.5.5 Ensayos de colonización sistémica en ratones BALB/c utilizando la genoteca de mutantes

A fin de evaluar las condiciones óptimas para realizar los ensayos de colonización sistémica, se realizaron ensayos en ratones BALB/c inoculando diferentes concentraciones de la genoteca suspendida en PBS o mucina al 5% en PBS. Para esto, una alícuota de 1 mL de la genoteca se utilizó para inocular 50 mL de CL+Kan y se incubó a 37°C sin agitación durante 4 h. Se tomó 1,5 mL del cultivo, se centrifugó, se lavó en PBS y se realizaron diluciones en PBS o mucina 5% para obtener suspensiones bacterianas de entre 10^6 y 10^8 ufc/mL. Además, mediante diluciones seriadas y siembra en placas de AL+Kan se determinó el número exacto de bacterias presente en cada suspensión. Posteriormente, una alícuota de 100 μ L de cada suspensión bacteriana se inyectó por vía intraperitoneal (IP) a grupos de

5-6 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida. Dos días después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Los órganos se homogeneizaron en un disruptor de tejidos Ultraturrax T25 (IKA) en 5 mL de PBS estéril. Se utilizó una alícuota de 100 μ L de cada homogenizado se utilizó para determinar el número total de bacterias por órgano mediante diluciones seriadas y siembra en placas de AL+Kan, las que fueron cultivadas toda la noche a 37°C.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de infección, se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente, pero inyectando 10^7 ufc suspendidas en mucina al 5% por vía IP. Además, el cultivo desde donde se obtuvo la alícuota a inyectar se centrifugó a 6.000 rpm por 15 min a 4°C y se guardó a -20°C. A partir de este material se extrajo gDNA para utilizarlo como muestra de referencia *input*, usando el sistema comercial *GenElute DNA Extraction Kit* (Sigma-Aldrich). Luego de 48 h de infección los ratones se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Los órganos se homogeneizaron en un disruptor de tejidos Ultraturrax T25 (IKA) en 5 mL de PBS estéril. Se utilizaron 100 μ L del homogeneizado para realizar el recuento de bacterias presentes en los órganos y el volumen restante se inoculó en 50 mL de CL+Kan y se incubó con agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación, el sedimento se lavó con PBS frío y se resuspendió en ~1 mL de PBS estéril. Se extrajo el gDNA a 100 μ L de cada suspensión bacteriana (muestras experimentales *output*) usando el sistema comercial *GenElute DNA Extraction Kit* (Sigma-Aldrich).

5.5.6 Hibridación de las muestras en microarrays genómicos

5.5.6.1 Preparación de las muestras

Se utilizó gDNA proveniente de la genoteca inicial cultivada *in vitro* (muestra *input*) y gDNA proveniente de las muestras *output*, recuperadas desde el hígado y bazo de los animales. Brevemente, se fragmentó y poliadeniló el DNA para luego amplificar la zona adyacente a la inserción del transposón en cada mutante presente en la genoteca analizada. Posteriormente, utilizando un promotor reconocible por la polimerasa del fago T7 presente en el transposón, se realizó una transcripción *in vitro* utilizando UTP marcado con un fluoróforo (Cy3 o Cy5), para luego hibridar estos transcritos en los *microarrays*.

Para cada muestra a analizar se utilizaron 4 µg de gDNA, que fueron sonicados en 300 µL de buffer Tris 1mM pH 8.0, utilizando 5 pulsos de 5 segundos con pausas de 30 segundos en hielo entre cada pulso, utilizando un sonicador Misonix XL-2000-010. Este procedimiento se realizó con el fin de obtener fragmentos con un tamaño promedio de ~1 kb. El DNA fragmentado se purificó utilizando el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) y se cuantificó mediante lectura espectrofotométrica.

Para la reacción de poliadenilación en el extremo 3' se utilizaron 1,6 µg de gDNA fragmentado, ajustando el volumen a 36 µL con agua destilada libre de nucleasas, siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

gDNA sonicado	36 µL
Buffer 4 NEB (10X)	5 µL
CoCl ₂ (2,5 mM)	5 µL
dATP (10mM)	2 µL
Transferasa terminal (NEB, 20U/µL)	2 µL
Volumen final	50 µL

Se incubó la reacción durante 30 min a 37°C y luego durante 10 min a 70°C. Los productos de la poliadenilación fueron purificados utilizando el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) y cuantificados por lectura espectrofotométrica.

Con el fin de amplificar las regiones del gDNA adyacentes a la inserción del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en cada mutante representada en las muestras, 500 ng del producto de la poliadenilación se empleó como templado para una reacción de PCR utilizando un partidor que aparea con una zona interna del transposón (partidor DOPR2) y un segundo partidor poli-dT (partidor CCT₂₄VN), que aparea con la zona poliadenilada. Se indica a continuación el protocolo utilizado:

Partidor CCT ₂₄ VN (10 µM)	1 µL
Partidor DOPR2 (10 µM)	1 µL
10X dNTPs (2 mM cada uno)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
10X Taq Buffer	5 µL
Taq (Invitrogen, 5 U/µL)	0,5 µL
gDNA sonicado	500 ng
H ₂ O libre de nucleasas	csp 50 µL
Volumen final	50 µL

94°C	1 min	30 ciclos
94°C	10 seg	
50°C	10 seg	
72°C	5 seg	
72°C	3 min	
4°C		

Para aumentar la cantidad de DNA obtenido que posee la zona adyacente a la inserción del transposón, se realizó una segunda reacción de amplificación por PCR (PCR anidado), utilizando esta vez como templado 2 μ L del producto de la primera amplificación. Para esto se utilizó el partidor CCT₂₄VN y un partidor que aparea en una zona más externa del transposón, KAN2FP1-B. Se indica a continuación el protocolo utilizado:

Partidor CCT ₂₄ VN (10 μ M)	1 μ L		
Partidor KAN2FP1-B (10 μ M)	1 μ L	94°C	1 min
10X dNTPs (2 mM cada uno)	5 μ L	94°C	10 seg
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L	50°C	10 seg
10X Taq Buffer	5 μ L	72°C	5 seg
H ₂ O libre de nucleasas	33,5 μ L	72°C	3 min
Taq (Invitrogen, 5 U/ μ L)	0,5 μ L	4°C	
DNA templado	2 μ L		
<hr/>			
Volumen final	50 μ L		

Los productos de la sonicación, del primer PCR y del PCR anidado se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TBE 1X (Tris 1 M, ácido bórico 0,9 M y EDTA 0,1 M, pH8,3).

Posteriormente, se realizó una reacción de transcripción *in vitro*, para lo cual se usó como templado el producto de la segunda reacción de PCR, utilizando el sistema comercial *AmpliScribe T7 Transcription Kit* (Epicentre). Para marcar el RNA sintetizado se usó UTP unido a los fluoróforos Cy3 o Cy5, según el siguiente protocolo:

H ₂ O libre de RNasa	0,8 µL
10X T7 Buffer	2 µL
ATP (100 mM)	1 µL
CTP (100 mM)	1 µL
GTP (100 mM)	1 µL
UTP (100 mM)	0,2 µL
DTT (100 mM)	2 µL
DNA templado	8 µL
Cy5 o Cy3-UTP (100 nmoles)	1 µL
Solución de Enzima AmpliScribe T7	2 µL
<hr/>	
Volumen final	19 µL

La mezcla se incubó a 37°C durante 4 h, luego de las cuales se agregó 1 µL de DNasa I y se incubó a 37°C durante 30 min para eliminar el DNA templado. El RNA marcado se purificó utilizando el sistema comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) y se cuantificó por lectura espectrofotométrica para ser utilizado en las hibridaciones en *microarrays* genómicos *Nimblegen* (Roche) diseñados a partir del genoma de *S. Typhi Ty2*.

5.5.6.2 Hibridación de *microarrays*

Para la hibridación, los *microarrays* se precalentaron a 42°C. Paralelamente, se preparó una mezcla que contenía 4 µg de RNA marcado en un volumen de 23,8 µL, 39 µL de buffer de hibridación, 15,6 µL del reactivo “Componente A” (*Nimblegen*, Roche) y 1,6 µL de oligonucleótido de alineamiento que hibrida marcando *spots* de referencia dentro el *microarray*. Las mezclas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se aplicaron sobre los *microarrays*. Inmediatamente después, se cubrieron los *microarrays* con un cubreobjetos y se depositaron en cámaras de

hibridación individuales (Corning Inc.). La hibridación se realizó durante toda la noche en baño de agua a 42°C. Al día siguiente, los *microarrays* se lavaron utilizando los materiales incluidos en el sistema comercial Nimblegen Hybridization kit, se secaron por centrifugación durante algunos segundos en una microcentrífuga de mesa y se guardaron protegidos de la luz hasta el momento de ser escaneados. Las intensidades de las señales de los *microarrays* se cuantificaron utilizando el programa *NimbleScan 2.4* (Nimblegen, Roche).

5.5.7 Obtención de las mutantes dirigidas por el método de Red-swap

5.5.7.1 Mutágenesis por intercambio alélico con productos de PCR

Las cepas mutantes fueron construidas utilizando el método de la recombinasa Red descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), con algunas modificaciones. Se diseñaron partidores de aproximadamente 60 nucleótidos, cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean la región del genoma a mutar. Los extremos 3' de los partidores contienen 20 nucleótidos que aparean con los extremos 5' o 3' del *cassette* de resistencia flanqueado por los sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) presente en los plasmidios pCLF1 (Tnp^R), pCLF2 (Cam^R) y pCLF4 (Kan^R). Las amplificaciones se realizaron en las condiciones descritas a continuación:

Partidor 1 (10 μ M)	1 μ L			
Partidor 2 (10 μ M)	1 μ L	95°C	1 min	
50X dNTPs (10 mM cada uno)	1 μ L	95°C	10 seg	30 ciclos
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ L	55°C	10 seg	
10X Taq Buffer	5 μ L	72°C	5 seg	
H ₂ O libre de nucleasas	39,7 μ L	72°C	3 min	
Taq (Invitrogen, 5 U/ μ L)	0,3 μ L	4°C		
pDNA	0,5 μ L			
Volumen final	50 μ L			

Los fragmentos obtenidos de estas reacciones fueron analizados en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X y purificados utilizando el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

Por otra parte, la cepa silvestre de cada serovar en estudio se transformó con el plasmidio pKD46, que codifica los componentes de la recombinasa Red del fago bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Las cepas transformadas con pKD46 se incubaron a 30°C con agitación en 30 mL de CL+Amp inoculados con una dilución 1:50 de un cultivo crecido toda la noche. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4 se suplementó con L-arabinosa 10 mM y se incubó durante 1 h. A partir de este cultivo inducido se prepararon bacterias electrocompetentes como se indica en la Sección 5.5.3.

Para la transformación, se mezcló 90 μ L de bacterias electrocompetentes con 10 μ L de producto de PCR dializado, siguiendo el protocolo de electroporación descrito en la Sección 5.5.3. Las transformantes fueron recuperadas en CL a 37°C

durante 1 h para luego ser seleccionadas en placas de AL suplementadas con el antibiótico correspondiente (Kan 50 µg/mL, Tmp 100 µg/mL o Cam 20 µg/mL). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

5.5.7.2 Verificación de las mutantes obtenidas

El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante PCR, utilizando partidores que aparean en regiones externas al sitio del reemplazo. Como DNA templado se utilizó una colonia resuspendida en 100 µL de agua destilada estéril. Se detallan a continuación las condiciones utilizadas para la amplificación:

Partidor 1 (10 µM)	0,4 µL			
Partidor 2 (10 µM)	0,4 µL	95°C	1 min	
50X dNTPs (10 mM cada uno)	0,4 µL	95°C	10 seg	30 ciclos
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µL	55°C	10 seg	
5X GoTaq Flexi Buffer	5 µL	72°C	5 seg	
H ₂ O libre de nucleasas	11 µL	72°C	3 min	
GoTaq (Promega, 5 U/µL)	0,2 µL	4°C		
DNA templado	2 µL			
Volumen final	20 µL			

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X.

5.5.8 Ensayos de competencia in vivo en el modelo murino de infección

Las mutantes a ensayar se cultivaron con agitación a 37°C durante toda la noche en 20 mL de CL con el antibiótico correspondiente. El día de la inoculación,

las bacterias se centrifugaron y lavaron con PBS estéril. Se preparó una mezcla en partes iguales de la cepa silvestre y las mutantes a ensayar, que contenía aproximadamente 10^6 o 10^7 ufc totales. Esta mezcla se inoculó por vía intraperitoneal (IP) en 100 μ L de PBS estéril en grupos de 5 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida. Se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril a partir de la mezcla inoculada y se sembraron en placas de AL y AL suplementadas con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C para obtener el recuento inicial de cada cepa. Dos días después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Los órganos se homogenizaron en 5 mL de PBS estéril utilizando un disruptor de órganos Ultraturrax T25 (IKA) y 200 μ L del homogenizado se utilizaron para realizar diluciones seriadas en PBS estéril, las que se sembraron en placas de AL y AL suplementadas con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C para obtener el recuento final de bacterias. Con los valores de ufc obtenidos, se calculó el índice de competencia (IC), según la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{(\text{ufc silvestre} / \text{ufc mutante})_{\text{output}}}{(\text{ufc silvestre} / \text{ufc mutante})_{\text{input}}}$$

Los valores de IC fueron expresados como logaritmo en base 10 (\log_{10}) y la significancia estadística se determinó utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas.

6. Resultados

6.1 Generación y validación de una genoteca de mutantes de S. Typhi

6.1.1 Construcción de una genoteca de mutantes de S. Typhi

Se obtuvo una genoteca de ~80.000 mutantes por inserción al azar del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en la cepa virulenta S. Typhi STH2370. Tomando en cuenta que el genoma de S. Typhi posee ~4.600 genes y ~4.800 Kb (Parkhill et al., 2001; Wain et al., 2002), la mutagénesis presentó una cobertura de ~17,4 veces el tamaño del genoma con un promedio de 1 inserción cada 60 pb. Esto nos permite estimar que incluso genes pequeños (<100 pb) han sufrido al menos una inserción, asegurándonos la representatividad de la genoteca construida.

A fin de validar la genoteca construida, se realizaron diversos experimentos utilizando mutantes individuales seleccionadas de manera aleatoria. Estos experimentos permitieron dar cuenta de la inserción al azar del transposón durante la mutagénesis

6.1.2 Detección de mutantes auxótrofas

Con el fin de caracterizar algunas de las mutantes generadas durante la mutagénesis, se analizaron fenotipos fácilmente identificables. Uno de ellos es la presencia de mutantes auxótrofas. Se define una mutante auxótrofa como aquella incapaz de sintetizar por si misma algún compuesto necesario para su crecimiento y que, en este caso, sí puede producirlo la cepa parental. *S. Typhi* es auxótrofa natural de cisteína y triptófano, por lo que se buscaron mutantes auxótrofas para compuestos distintos de estos aminoácidos, usando medio mínimo suplementado con ambos aminoácidos (EGCT). Luego de sembrar 426 mutantes seleccionadas al azar en medio mínimo EGCT y en medio rico, se encontró que 12 presentaban algún tipo de auxotrofia. Este resultado nos indica que como resultado de la mutagénesis se generaron nuevas mutantes auxótrofas. Estas corresponden aproximadamente a un 2,8% del total de mutantes de la genoteca.

6.1.3 Detección de mutantes con deficiencias en la producción del LPS

Otro fenotipo fácilmente identificable es la incapacidad de producir un LPS completo. El LPS es un componente fundamental de bacterias Gram negativo y corresponde a un glicolípido complejo, constituido por tres dominios estructurales: el lípido A, la región del *core* y el antígeno O (AgO). En el caso particular de *S. Typhi*, el AgO está constituido por unidades de cinco azúcares (-D-manosa, -D-tivelosa, -L-ramnosa, -D-galactosa y ocasionalmente -D-glucosa) repetidas entre 1 y 40 veces (**Figura 4A**). Inicialmente, se buscaron mutantes que generaran colonias con fenotipo rugoso. Este fenotipo resulta frecuentemente de la incapacidad de las bacterias para producir un AgO polimérico. Esto puede ser evaluado mediante extracción del LPS a partir de un cultivo bacteriano y la resolución de estas muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En primer lugar, se buscaron colonias de mutantes que presentaran bordes irregulares (fenotipo rugoso) y se escogieron al azar 16 mutantes a las cuales se les analizó la producción del LPS. En la **Figura 2B** se muestra el perfil electroforético del LPS producido por la cepa silvestre (WT), en el que se puede observar un patrón escalonado típico debido a los diferentes grados de polimerización del AgO. Asimismo, podemos observar que algunas de las mutantes escogidas (11, 30 y 50) presentaron un LPS completo (similar a la cepa WT), mientras que otras mutantes (39, 65, 74, 78, 107 y 149) presentaron diferentes grados de deficiencia en la producción o ensamblaje del un LPS normal, lo que explicaría el fenotipo rugoso observado cuando se crecieron el AL.

Se observan además algunas mutantes que presentan un LPS completo (11, 30 y 50) en las que el fenotipo rugoso no está dado por un defecto en la biosíntesis o el ensamblaje del LPS.

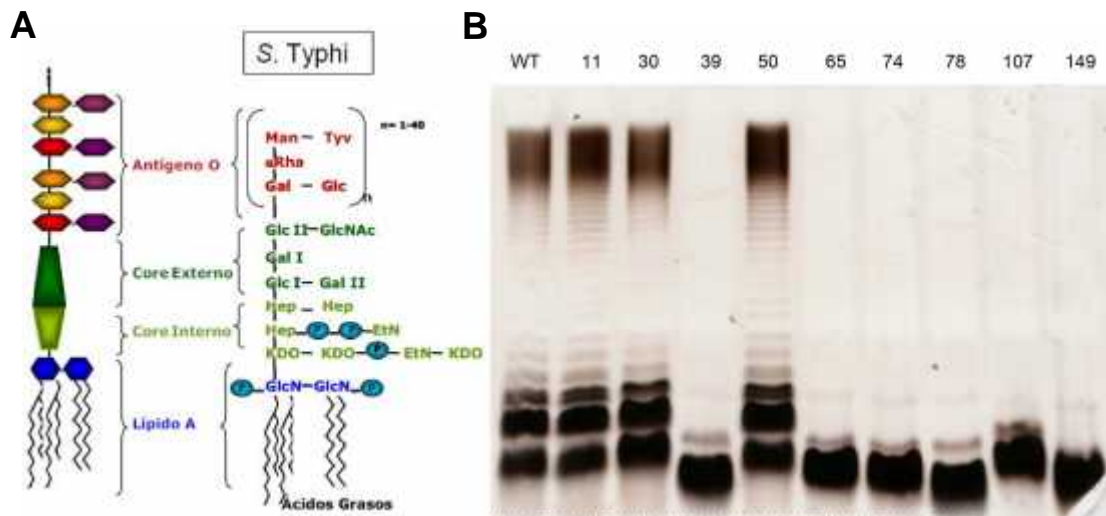


Figura 2 – Presencia de mutantes con deficiencia en la producción del LPS en la genoteca. (A) Diagrama esquemático de la estructura del LPS de *S. Typhi*. **(B)** Perfiles electroforéticos del LPS purificado a partir de la cepa silvestre (WT) y algunas mutantes con probable fenotipo rugoso.

En conclusión, la identificación de mutantes auxótrofos y de mutantes con deficiencias en la producción del LPS, generadas durante la mutagénesis, nos demuestra la diversidad de mutantes que podemos encontrar en la genoteca construida.

6.1.4 Detección del transposón por PCR

A fin de detectar la presencia del transposón en mutantes generadas durante la mutagénesis, se realizó una amplificación por PCR de una porción interna del gen de resistencia a kanamicina presente en el transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2>. Se analizaron un total de 12 mutantes al azar más 8 mutantes con fenotipos identificados en análisis previos: 4 mutantes auxótrofos y 4 mutantes rugosas. Como se observa en la **Figura 3**, se detectó el transposón en cada una de las 20 mutantes seleccionadas al azar. También se detectó el transposón en las mutantes rugosas y auxótrofas previamente analizadas, así como a partir de una muestra de la genoteca de mutantes. En cambio, no se detectó el transposón en la cepa silvestre (**Figura 3**).

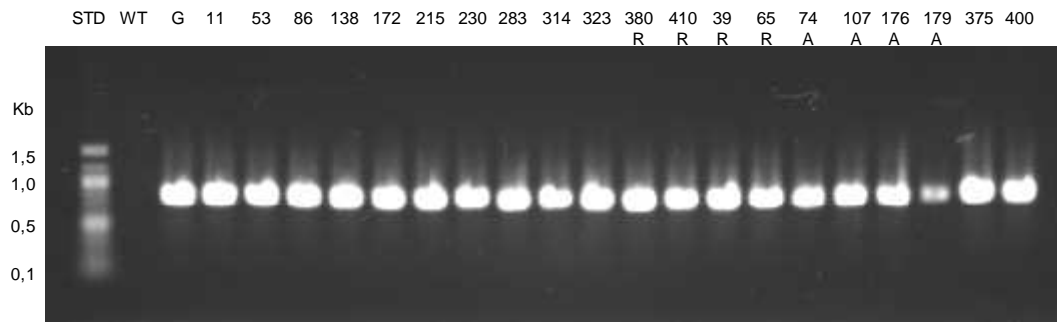


Figura 3 – Detección del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en mutantes de *S. Typhi* mediante PCR. STD: Estándar de peso molecular. WT: cepa silvestre, G: genoteca, R: mutante rugosa y A: mutante auxótrofa.

6.1.5 Detección del número de inserciones por Southern blot

Para determinar el número de inserciones en mutantes seleccionadas al azar, se realizó un Southern blot usando como sonda el producto de PCR antes mencionado. Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 4**. Se observa la presencia de bandas de diferentes pesos moleculares, lo que indica la presencia de inserciones en diferentes regiones del genoma en todas las mutantes estudiadas. Esto evidencia la heterogeneidad de la genoteca construida. Como es esperado, no se detectó inserción del transposón en la cepa silvestre. Sin embargo, también se observaron algunas mutantes con más de una señal de hibridación. Probablemente, esto se pueda atribuir a la presencia de contaminaciones en la muestra, digestiones parciales de la misma o a la generación de productos de PCR inespecíficos (que no corresponden a la sonda) debido al procedimiento de marcación utilizado y no a múltiples inserciones en dichas mutantes.

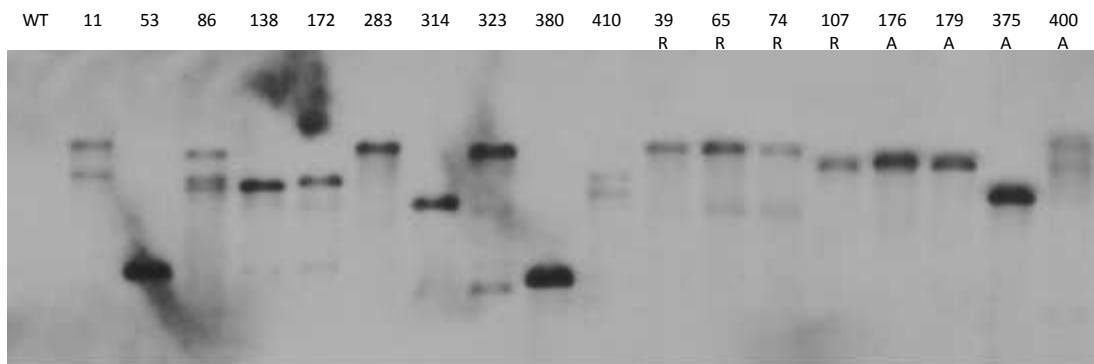


Figura 4 – Detección de número de inserciones del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> en mutantes de S. Typhi mediante Southern blot. Se hibridó por Southern blot para detectar el número de inserciones del transposón en mutantes individuales. Se incluyeron en el análisis: la cepa silvestre (WT), 10 mutantes al azar, 4 mutantes rugosas (R) y 4 mutantes auxótrofas (A).

6.2 Ensayos de colonización sistémica en ratones BALB/c utilizando la genoteca de mutantes

Luego de caracterizar la genoteca construida, la utilizamos para realizar ensayos de colonización sistémica de ratones BALB/c. Estos ensayos nos permitieron obtener las muestras para realizar el análisis de mutantes que se encuentran bajo selección negativa *in vivo*.

Inicialmente, se buscó la condición óptima para la inoculación de la genoteca, que corresponde a aquella en que no hubiera una diferencia de más de dos órdenes de magnitud entre la cantidad de bacterias inoculadas y las recuperadas desde los órganos. Como se muestra en la **Figura 5** una alícuota de 1 mL de la genoteca se inoculó en 50 mL de LB+Kan y se cultivó por 4 h de manera estática. Se realizaron diluciones para obtener la concentración adecuada de bacterias a inyectar. Las bacterias se inocularon por vía IP en grupos de 5-6 ratones BALB/c hembras. Luego de 48 horas de infección, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo de manera aséptica bazo e hígado. Los órganos se homogenizaron en PBS estéril y se determinó la cantidad de bacterias por órgano, mediante diluciones seriadas de los homogenizados y siembra en placa.

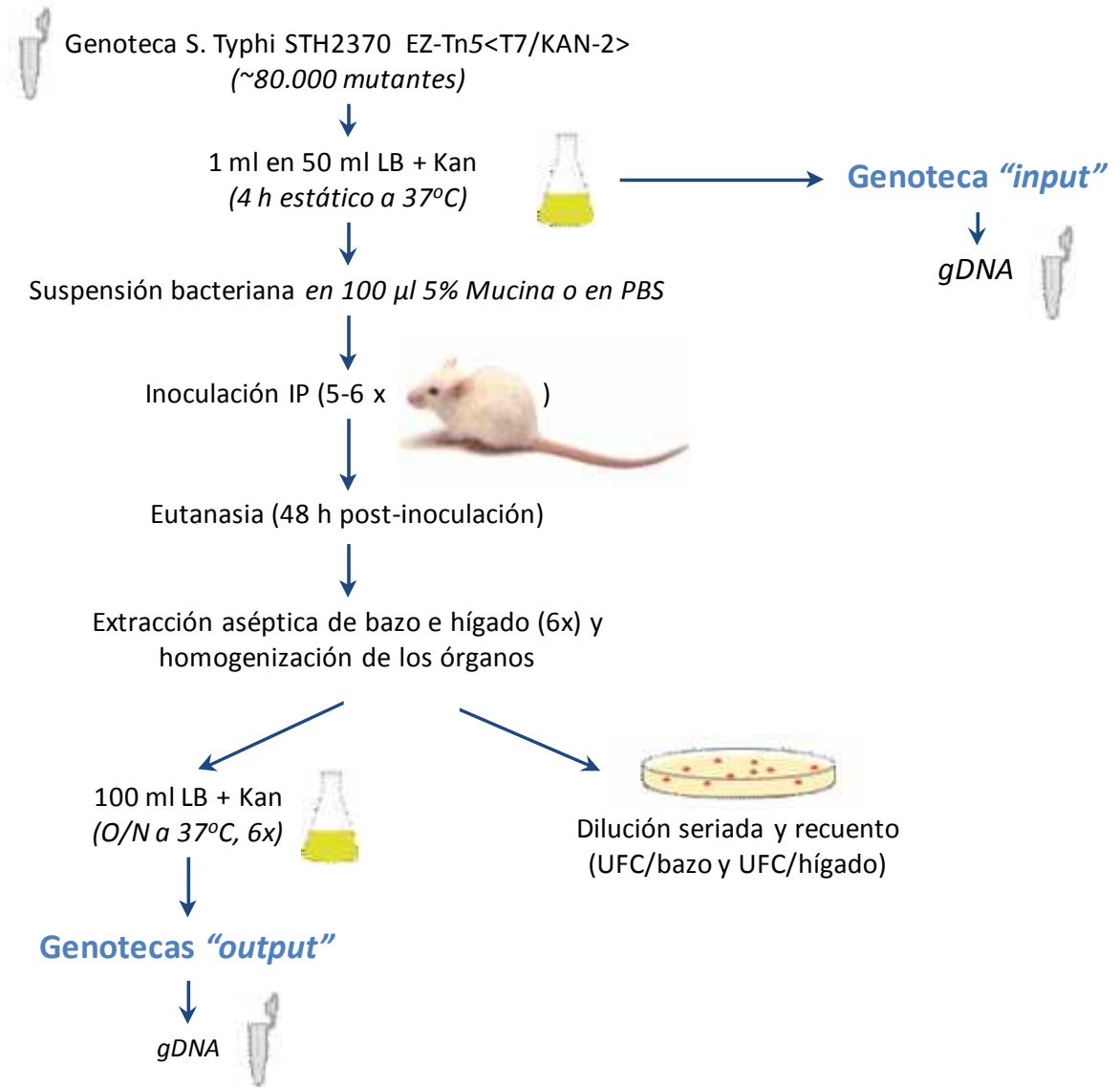


Figura 5 – Esquema general del protocolo utilizado para los ensayos de colonización sistémica de una genoteca de mutantes de *S. Typhi* STH2370. Se muestra el diagrama del protocolo utilizado para realizar los ensayos de colonización sistémica utilizando la genoteca de mutantes de *S. Typhi*.

A fin de encontrar las condiciones óptimas para realizar el ensayo, se probaron distintas condiciones de inoculación de la genoteca, primero variando la concentración de bacterias en la suspensión inyectada y luego variando el vehículo usado para suspender las bacterias (PBS o mucina al 5% en PBS). La **Figura 5** resume los resultados de los ensayos de colonización en las diferentes condiciones. Observamos que al utilizar mucina 5% como vehículo se recuperó una mayor cantidad de bacterias en los órganos respecto a la misma dosis utilizando PBS. Esto nos permitió concluir que este tratamiento aumenta los índices de colonización de órganos internos. Además, se observa que la condición en que hubo una mayor colonización de los órganos, corresponde a la inyección IP de 10^7 ufc suspendidas en mucina al 5%. Sin embargo, en esta condición se observó gran variabilidad entre la cantidad de bacterias recuperadas desde los diferentes ratones inoculados con una misma dosis (**Figura 6**). Es importante destacar que *S. Typhi*, debido a su restringido espectro de hospedero, presenta grandes dificultades para colonizar otros hospederos animales. En este trabajo, logramos generar un modelo que nos permitió obtener índices de colonización suficientes para realizar el análisis de mutantes bajo selección negativa.

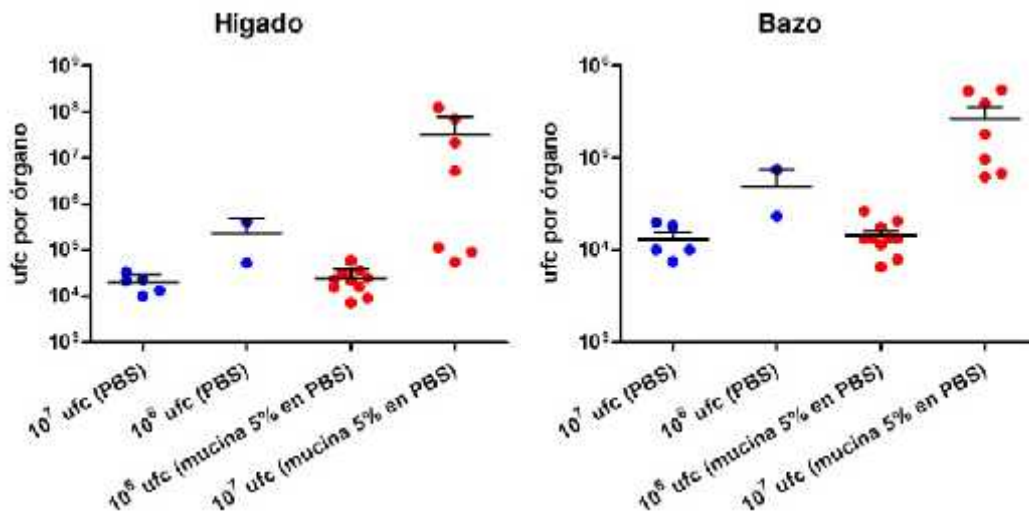


Figura 6 – Colonización del hígado y bazo de ratones BALB/c por la genoteca de mutantes de *S. Typhi*. Se indica el número de bacterias inoculadas, resuspendidas en 100 μ l de las diferentes soluciones. En todos los casos se inocularon grupos de entre 5 y 10 animales. Cada punto representa las ufc recuperadas desde el hígado o bazo de un animal. Se muestran sólo los resultados obtenidos de los animales que sobrevivieron 48 h post inoculación. También se muestra el promedio de la población (barra horizontal) y el error estándar.

Luego de analizar el nivel de colonización en las distintas condiciones estudiadas, decidimos analizar la composición de las poblaciones de mutantes recuperadas de las muestras *output* de aquellos ratones que presentaron mayores índices de colonización (con valores sobre 10^6 ufc/hígado y $5 \cdot 10^5$ ufc/bazo), que corresponden a 3 de las muestras en que se inyectaron 10^7 ufc resuspendidas en mucina al 5% (**Figura 6**). Las 3 muestras seleccionadas provienen de dos experimentos independientes, por lo que se analizaron en comparación con sus correspondientes muestras *input* (**Figura 7**). Así, las muestras *output* provenientes del hígado 1 (H1) y el bazo 1 (B1) se compararon con el *input* 1. Por su parte, las

muestras *output* provenientes de los hígados 2 y 3 (H2 y H3) y los bazos 2 y 3 (B2 y B3) se compararon con el *input* 2.

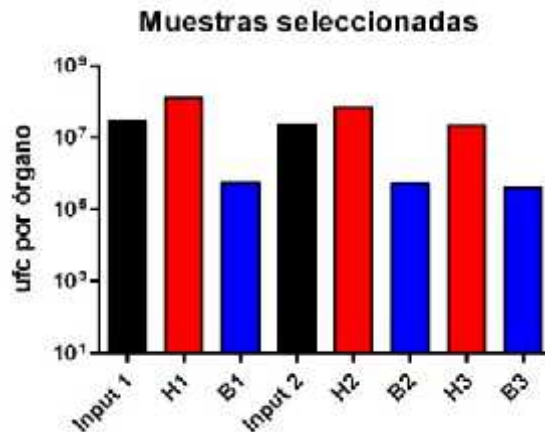


Figura 7 – Colonización de ratones BALB/c por la genoteca de mutantes de *S. Typhi* en las muestras seleccionadas para realizar las hibridaciones en microarrays. El gráfico muestra las ufc recuperadas desde el hígado (H1, H2 y H3, barras rojas) y desde el bazo (B1, B2 y B3, barras azules) de cada uno de los tres animales seleccionados para realizar el análisis de mutantes bajo selección negativa *in vivo* mediante hibridaciones comparativas en *microarrays* genómicos. Las barras negras indican el recuento de ufc en los *inputs* correspondientes.

6.3 Identificación global de mutantes de *S. Typhi* que presentan deficiencias en la colonización sistémica de ratones BALB/c

A fin de identificar las mutantes de *S. Typhi* que presentan defectos en la colonización sistémica de ratones BALB/c, se analizaron las poblaciones de mutantes presentes en las muestras *input* y *output* seleccionadas. A partir de estas muestras se extrajo gDNA, el cual se sometió a un protocolo de amplificación de la zona adyacente a la inserción del transposón (**Figura 8**). Para esto, el DNA se fragmentó, poliadeniló para luego amplificar mediante dos reacciones de PCR, la

zona adyacente a la inserción del transposón en cada mutante presente en la genoteca analizada. Posteriormente, gracias al promotor T7 presente en el transposón, se realizó una transcripción *in vitro* utilizando UTP marcado con un fluoróforo (Cy3 o Cy5), para luego hibridar estos transcritos en los *microarrays* genómicos de *Salmonella*.

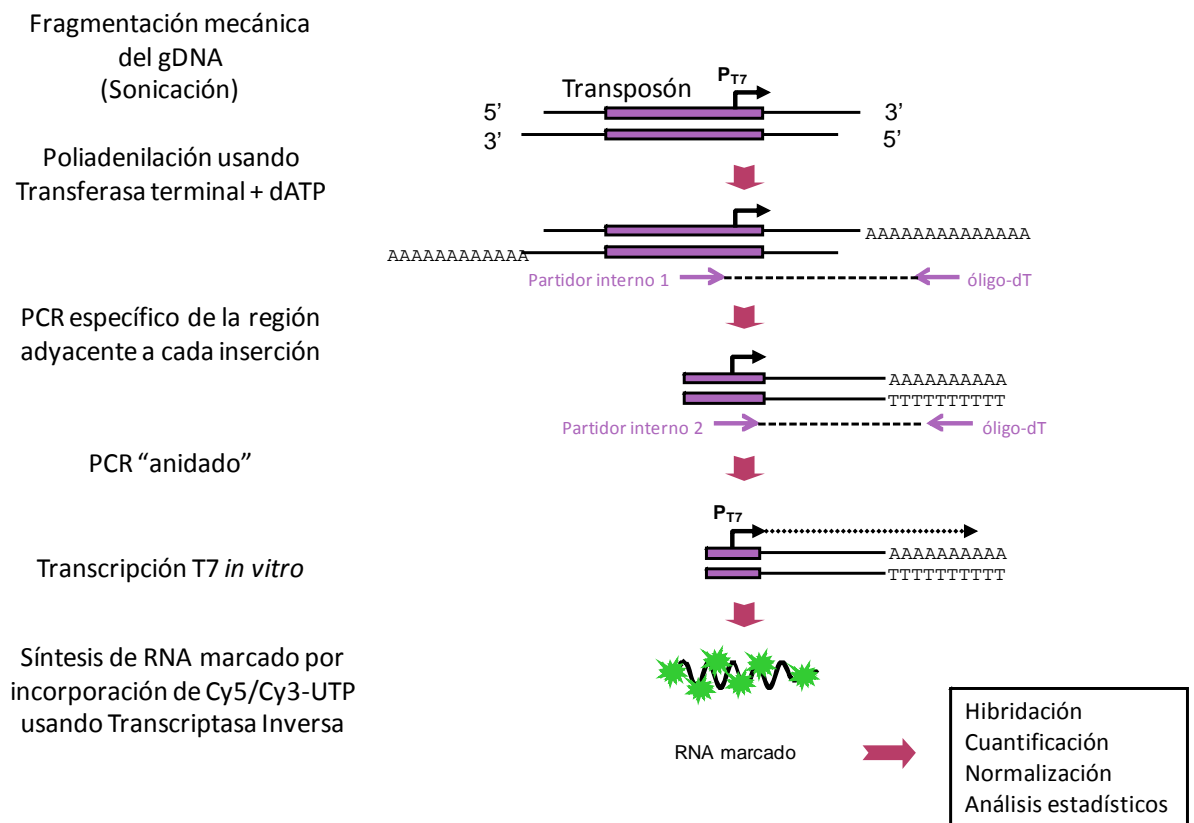


Figura 8 – Análisis global de mutantes de *S. Typhi* que presentan deficiencias en la colonización sistémica. Se muestra el diagrama del protocolo de amplificación de la zona adyacente a la inserción de transposón utilizado para la identificación de las mutantes que se pierden bajo selección negativa *in vivo*.

Los productos de la sonicación, poliadenilación y de las reacciones de PCR y PCR anidado se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TBE 1X. En la **Figura 9** se muestran los resultados representativos obtenidos durante la amplificación de las muestras.

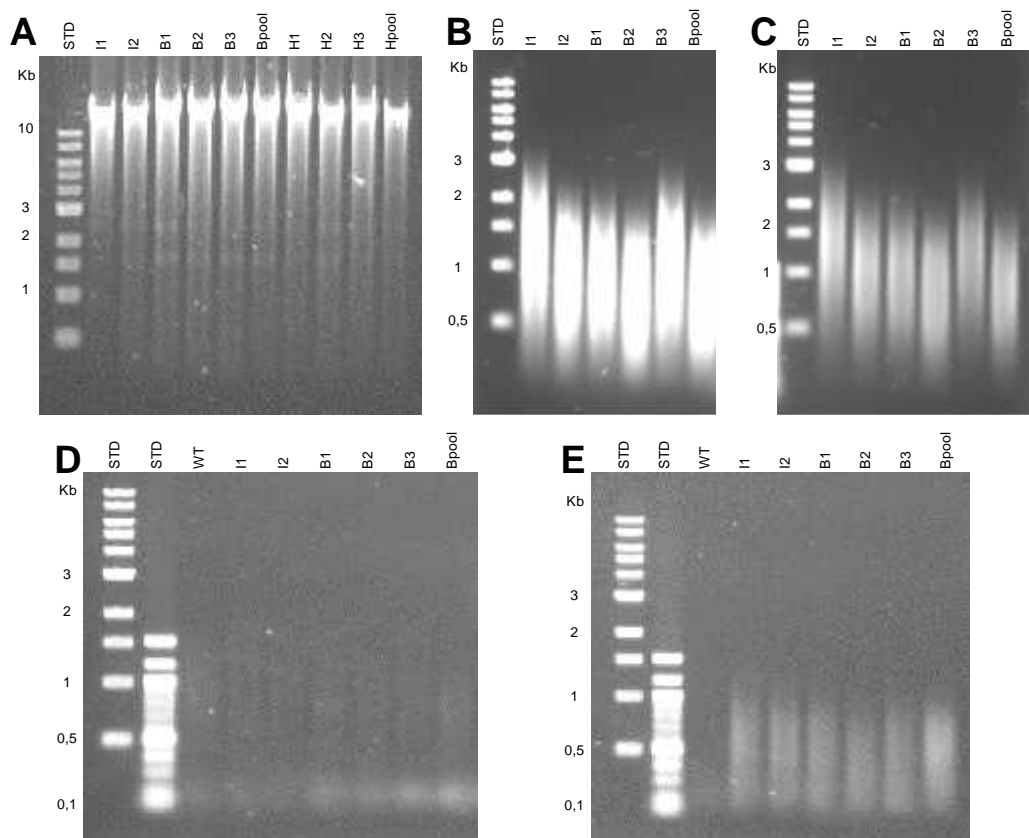


Figura 9 – Amplificación de la región adyacente a cada una de las inserciones presentes en muestras input y output de la genoteca de *S. Typhi*. Se muestran resultados representativos de los pasos de amplificación de la zona adyacente a la inserción del transposón. **(A)** gDNA obtenido de las muestras *input* y *output* correspondientes. **(B)** Fragmentos obtenidos después de la fragmentación mecánica por sonicación. **(C)** Productos de poliadenilación **(D)** Productos de la primera reacción de PCR **(E)** Productos de la reacción de PCR anidado. STD: estándar de peso molecular. WT: cepa silvestre, I1: input 1, I2: input 2, B1: bazo 1, B2: bazo 2, B3: bazo 3, Bpool: muestra *pool* de bazos, H1: hígado 1, H2: hígado 2, H3: hígado 3, Hpool: muestra *pool* de hígados.

Durante el marcaje e hibridación de las muestras hubo inconvenientes con aquellas recuperadas de hígados, las que presentaron una menor incorporación del fluoróforo y por ende baja señal al hibridar estas muestras en los *microarray*. Probablemente, esto se debió a contaminación de la muestra con DNA eucarionte proveniente del tejido homogeneizado, lo que interfirió con el protocolo de amplificación y se tradujo en poca señal en los *microarrays* en que se hibridaron. Debido a esto, decidimos efectuar el análisis de mutantes bajo selección negativa utilizando únicamente las muestras provenientes de bazo, muestras que presentaron buena incorporación del fluoróforo y buena señal en el *microarray*. Se analizaron un total de 6 muestras, las dos muestras *input* y las muestras *output* B1, B2, B3 y una muestra (Bpool) que corresponde a la mezcla en partes iguales de las muestras de bazo mencionadas anteriormente.

Para las hibridaciones se utilizó un *microarray* de tipo *Nimblegen* (Roche), que corresponde a un *tiling array* basado en el genoma de *S. Typhi* Ty2 y que posee alrededor de 385.000 *spots*. Este se generó con sondas de ~50 pb, utilizando una ventana móvil de 25 pb y que cubre ambas hebras del genoma de *S. Typhi*. Como se mencionó en la sección “Materiales y Métodos”, luego de realizar la hibridación, se escaneó el *microarray* y se utilizó el programa *NimbleScan 2.4* (*Nimblegen*, Roche) para identificar cada *spot* y cuantificar la intensidad de fluorescencia de las señales obtenidas. Los datos de intensidad se ingresaron en el sitio *WebarrayDB* (<http://webarraydb.org>), que recopila la información de todos los *spots* que corresponden a un mismo gen, los normaliza y analiza utilizando las herramientas estadísticas implementadas en el sitio. Posteriormente, la misma plataforma nos

permitió comparar la información de dos o más *microarrays*. Al comparar las mutantes presentes en las muestras *input* y *output* entrega una predicción del cambio en la población de mutantes luego de la condición selectiva, indicando aquellas que se pierden o se ganan en esa población. En el caso de las hibridaciones en *microarrays* de tipo Nimblegen, este análisis se realiza mediante la comparación de los transposones detectados en cada gen en las muestras *input* y *output*. Para esto, la plataforma genera una predicción que indica si la presencia del transposón provoca una pérdida o una ganancia de esa mutante en la población. Esta predicción se realizó para cada gen del genoma en que se detectaron inserciones. Luego, establecimos un sistema de puntaje o *score* para facilitar el análisis de estas bases de datos. Los resultados obtenidos para cada gen en cada una de las muestras de los bazos se calificaron con un *score* de 1 si se observaba que las mutantes en dicho gen se perdían de la población. Por otra parte, se calificaron con un *score* de 0 si no se observaron cambios o si las mutantes aumentaban en la población. Por lo tanto, el *score* final para cada gen se encontraba en un rango entre 0 (cuando no hubo variación en ninguna de las muestras) y 4 (cuando se detectó pérdida de las mutantes en un determinado gen en cada uno de las cuatro muestras *output* analizadas). Finalmente, si la predicción para un gen entregaba un *score* final mayor o igual a 3 se consideró que las mutantes en ese gen se encontraban bajo selección negativa *in vivo*.

Utilizando este análisis se determinó que mutantes en 755 genes de *S. Typhi* estarían bajo selección negativa *in vivo* de los 4.361 genes para los que se tiene predicción. El análisis de estos datos mostró la pérdida de mutantes en genes

relacionados con la biosíntesis de purinas (*aroK*, *aroB*, *purN* y *purF*) y de LPS (*waaB*, *waaY*, *waaZ* y *waaL*), reguladores transcripcionales globales asociados con virulencia (*phoP*, *phoQ*, *ompR* y *envZ*) y genes codificados en islas de patogenicidad conservadas en *Salmonella*, como SPI-1 (*invA* e *invG*), SPI-2 (*ssaE*, *sseA*, *sseB* y *sseD*) y SPI-5 (*sipB*, *sipC* y *pipA*). Todos estos genes han sido reportados en la literatura como necesarios por distintos serovares de *Salmonella* para la infección de un hospedero animal o para la internalización y/o sobrevivencia intracelular en macrófagos en cultivo (Bearson et al., 1998; Chan et al., 2005; Guina et al., 2000; Gunn and Miller, 1996; Hensel et al., 1997; Hensel et al., 1995; Lawley et al., 2006; Miller et al., 1989b; Wood et al., 1998). Esto nos permite validar tanto el sistema de detección, como el modelo animal utilizado. Por otra parte, también se observan bajo selección negativa algunos genes relacionados con la biosíntesis y exportación de la cápsula Vi (*vexA*, *vexC*, *vexD* y *tviC*), que corresponden a genes específicos de este serovar (Wetter et al., 2012).

La **Figura 10** muestra los 755 genes observados bajo selección negativa *in vivo* agrupados según sus categorías funcionales. Se observa una gran cantidad de genes que se agrupan en las categorías funcionales de islas de patogenicidad, superficie y síntesis de componentes de la envoltura celular (LPS, fimbrias, proteínas de membrana, etc.), genes que codifican reguladores globales y genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de péptidos y solutos, además de genes relacionados con la expresión génica. Además, cabe destacar que existe una gran cantidad de genes que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida que se encuentran bajo selección negativa. Finalmente, todos aquellos

genes que no se pudieran clasificar en alguna de las otras categorías funcionales, se agrupan en “Otros”. Este grupo incluye genes que codifican: (i) los tRNAs para los aminoácidos serina, arginina, valina, metionina y leucina, (ii) endoproteasas, ribonucleasas y otras proteínas necesarias para el procesamiento de las subunidades ribosomales 16S y 23S, (iii) proteínas de resistencia a pH ácido y a polimixina B y (iv) la polifosfato kinasa Ppk.

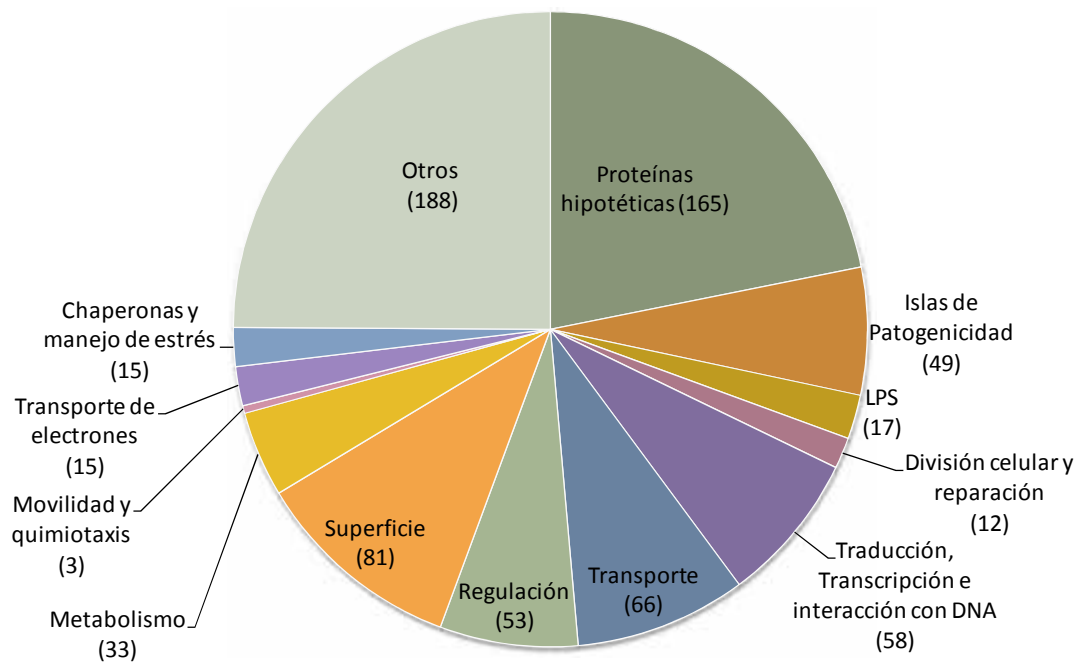


Figura 10 – Categorías funcionales de genes de *S. Typhi* bajo selección negativa in vivo. Se muestran las principales categorías funcionales de genes de *S. Typhi* identificados como necesarios para la colonización sistémica de ratones BALB/c.

6.4 Análisis comparativo de mutantes bajo selección negativa en tres serovares de Salmonella

Una vez que obtuvimos el análisis de mutantes de *S. Typhi* bajo selección negativa *in vivo*, realizamos el análisis comparativo a fin de identificar aquellas mutantes que se pierden bajo selección negativa en los tres serovares estudiados. Para esto, utilizamos las bases de datos de nuestro laboratorio para mutantes bajo selección negativa de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, obtenidas mediante una metodología similar a la descrita en esta tesis. En primer lugar, se realizó un alineamiento de las bases de datos de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, que corresponden al análisis de genotecas de transposones en ratones BALB/c que fueron analizadas utilizando *microarrays* de productos de PCR. Para identificar las mutantes de estas genotecas que se encontraban bajo selección negativa *in vivo*, se calculó el índice “M”, que representa la razón de cambio entre la fluorescencia emitida en la muestra *input* versus la muestra *output* para cada gen en estudio, según la siguiente ecuación:

$$M = \text{Log}_2 (\text{Output}_x / \text{Output}_{\text{total}}) - \text{Log}_2 (\text{Input}_x / \text{Input}_{\text{total}})$$

En esta ecuación, Input_x y Output_x corresponden a la fluorescencia emitida por el *spot* que representa al gen X en la muestra *input* y *output*, respectivamente. Por su parte, $\text{Input}_{\text{total}}$ y $\text{Output}_{\text{total}}$ corresponden a la fluorescencia total emitida por todos los *spots* en la muestra *input* y *output*, respectivamente. Para decir que una mutante se encontraba bajo selección negativa en la población de mutantes de las

genotecas, se utilizó como criterio que las mutantes tuvieran un valor de M igual o inferior a -0.75. Este análisis nos permitió identificar que mutantes en 247 genes se encuentran bajo selección negativa *in vivo* y son compartidos por estos dos serovares. Algunos de los genes identificados se encuentran codificados en las islas de patogenicidad conservadas dentro del género *Salmonella*. Otros corresponden a genes necesarios para la biosíntesis de compuestos aromáticos y del LPS, además de genes que codifican reguladores globales, entre otros.

Al comparar ahora estos datos con la base de datos de *S. Typhi* se observan mutantes en ~130 genes que se encuentran bajo selección negativa (**Figura 11**). De esta manera, observamos la pérdida de mutantes en genes codificados en islas de patogenicidad conservadas como SPI-1 y efectores del T3SS_{SPI-1}, y genes pertenecientes a la SPI-2 y efectores del T3SS_{SPI-2}. Dos de los genes codificados en la SPI-4 también se observaron bajo selección negativa, *STM4258* y *STM4259* (*SEN4027* y *SEN4028*, *t4163* y *t4164*) que corresponden a una proteína de membrana putativa y un componente de un transportador de la superfamilia ABC hipotético. Se observó la pérdida de mutantes en genes relacionados con el metabolismo central (*pyk*, *ndh*, *nag* y *tktA*), con la biosíntesis de purinas y compuestos aromáticos (*aro*, *pur* y *gua*) y con la envoltura celular como los *loci rfa* (*waa*) y *rfb* (*wba*), necesarios para la síntesis y modificación del LPS. Algunos reguladores globales asociados a patogenicidad también se encuentran bajo selección negativa, como *phoP*, *envZ*, *rpoN*, *dam* y *rsd*.

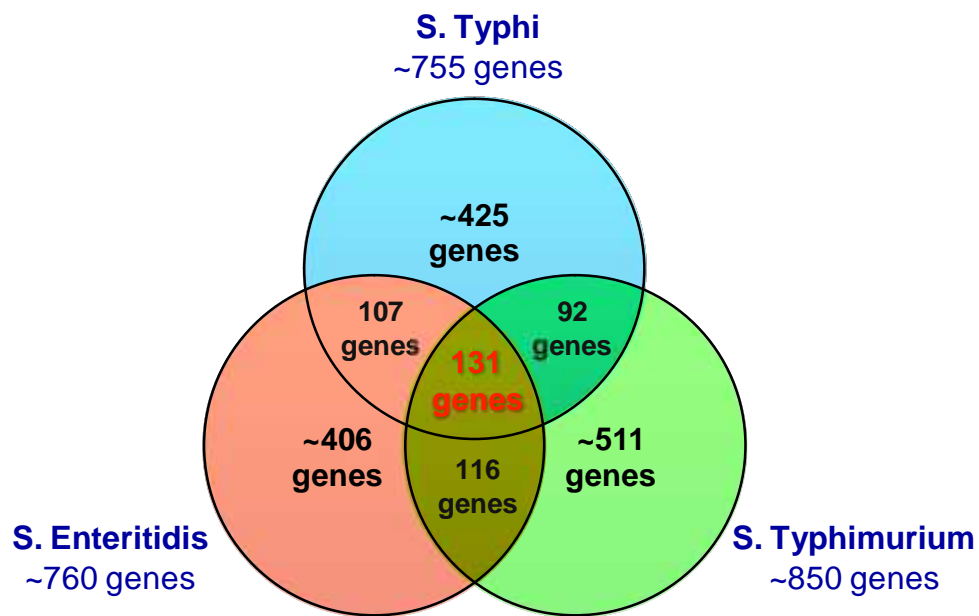


Figura 11 – Genes bajo selección negativa en los tres serovares estudiados. El diagrama de Venn muestra el número total de genes que se observan bajo selección negativa en los tres serovares estudiados (en azul), los que son compartidos por dos serovares y el número que se comparte en los tres serovares en estudio (131 genes). El número de genes se obtuvo según los criterios de atenuación definidos en las Secciones 6.3 y 6.4

Respecto a genes que se observan bajo selección negativa y no descritos en la literatura como necesarios para la patogenicidad de los tres serovares de *Salmonella* en estudio, se encuentran, por ejemplo, aquellos que codifican un sistema transportador de proteínas *Twin-Arginine*, que corresponde a una de las dos vías de transporte de proteínas hacia el espacio periplasmático; genes que codifican para las diferentes subunidades de una NADH deshidrogenasa (genes *nuo*); un locus (*sapBF*) que corresponde a un transportador del tipo ABC para péptidos. Se observaron además genes involucrados en el transporte de solutos, como un gen que está involucrado en el transporte de potasio (*trkH*). Nuevamente, se observan

bajo selección negativa genes que codifican proteínas hipotéticas como *STM0557* (*SEN0535*, *t2304*) y *STM0478* (*SEN0497*, *t2363*).

La **Figura 12** como se agrupan en categorías funcionales los 131 genes comunes a los 3 serovares y que serían necesarios para la colonización sistémica de ratones BALB/c. De manera similar a lo observado en el análisis de mutantes de *S. Typhi*, las categorías funcionales más representadas corresponden a genes codificados en islas de patogenicidad, proteínas hipotéticas, componentes de superficie (LPS, proteínas de membrana, etc) y transporte.

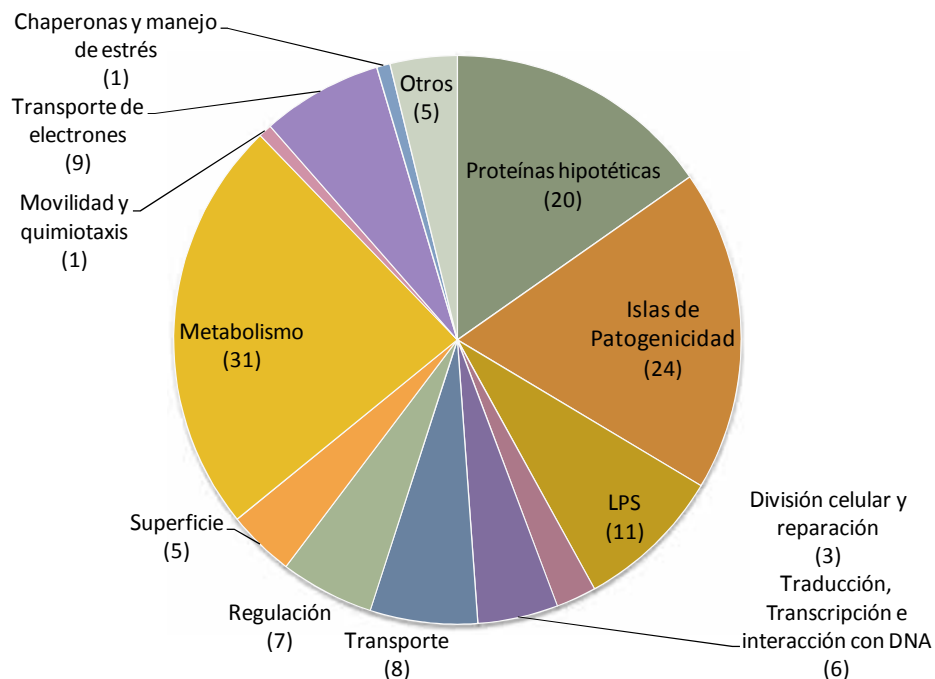


Figura 12 – Genes comunes a los tres serovares bajo selección negativa in vivo, agrupados según la categoría funcional a la que pertenecen. Se muestran las principales categorías funcionales de los genes comunes a los tres serovares en estudio identificados como necesarios para la colonización sistémica de ratones BALB/c.

6.5 Mutantes del operón *tatABC* son atenuadas en los tres serovares

Para comprobar las predicciones obtenidas en el análisis global de mutantes bajo selección negativa *in vivo*, se seleccionó el operón *tatABC*. Nuestros datos derivados análisis global sugieren que este sistema es requerido por los tres serovares en estudio para la colonización sistémica de ratones BALB/c. Para corroborar esta predicción, se generaron mutantes del operón en los tres serovares en estudio mediante el método de reemplazo alélico por productos de PCR (Red Swap) y se realizaron ensayos de competencia *in vivo* en ratones BALB/c con las mutantes generadas. Para estos ensayos, se inoculó por vía IP una mezcla en partes iguales de la cepa silvestre y las mutantes a ensayar en 5 ratones BALB/c hembras. Luego de 48 h de infección, los animales fueron eutanizados y se les extrajo bazo e hígado. Los órganos se homogenizaron en PBS estéril y se cuantificó la cantidad de bacterias silvestres y mutantes, mediante diluciones seriadas y siembra en placas con diferentes antibióticos. A partir de esta cuantificación se calculó el índice de competencia (IC), según la fórmula indicada en la sección “Materiales y Métodos”. Así, un valor de $IC < 1$ indica que la mutante posee una capacidad de colonización menor que la cepa silvestre. Por el contrario, un valor de $IC > 1$ indica que la mutante analizada posee una capacidad de colonización mayor que la cepa silvestre y, por último, un valor de IC igual o cercano a 1 significa que ambas bacterias tienen una capacidad de colonización similar. Se utilizó como control interno la mutante *aroA* en cada uno de los serovares estudiados.

Para los ensayos de competencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se preparó una mezcla de la cepa silvestre y las mutantes *tatABC* y *aroA* en proporción 1:1:1. Esta mezcla contenía $\sim 10^6$ ufc suspendidas en 100 μ L de PBS estéril y se inoculó por vía IP en 5 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida. En el caso del ensayo de *S. Typhi*, se inoculó una mezcla similar que contenía $\sim 10^7$ ufc suspendidas en 100 μ L de PBS estéril. Luego de 48 h de infección se extrajo el bazo e hígado de los animales infectados, los que se homogenizaron en PBS estéril frío. Se realizó el recuento de bacterias totales y mutantes y se calculó el índice de competencia. Los resultados de estos ensayos de competencia se muestran en las **Figuras 13, 14 y 15**.

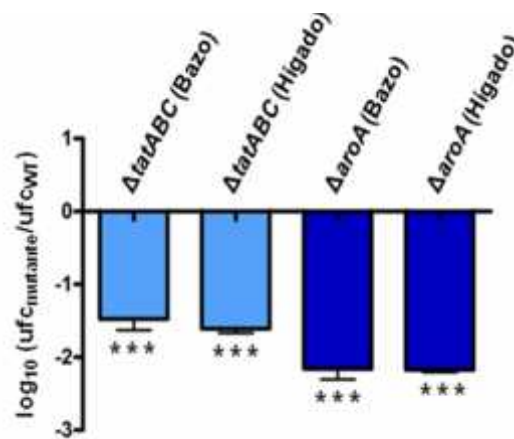


Figura 13 – Ensayo de competencia in vivo entre la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y mutantes *tatABC* y *aroA*. El gráfico muestra los valores de IC expresados como logaritmo en base 10, obtenidos en el experimento de competencia para comparar la capacidad de colonización de órganos internos de ratones BALB/c entre mutantes *tatABC* y *aroA* versus la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. Se muestra el promedio de 4 o 5 réplicas biológicas \pm SE. La significancia estadística se determinó utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas (***) = $P < 0,001$).

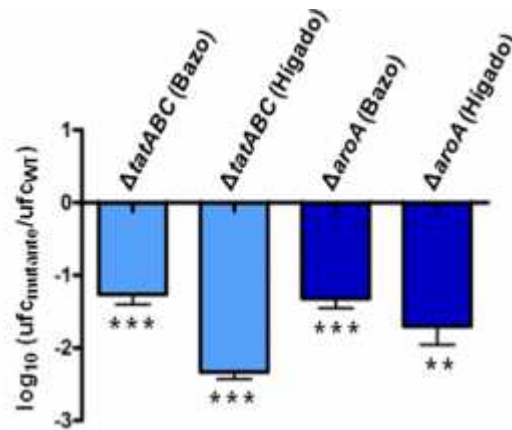


Figura 14 – Ensayo de competencia in vivo entre la cepa silvestre de *S. Enteritidis* y mutantes *tatABC* y *aroA*. El gráfico muestra los valores de IC expresados como logaritmo en base 10, obtenidos en el experimento de competencia para comparar la capacidad de colonización de órganos internos de ratones BALB/c entre mutantes *tatABC* y *aroA* versus la cepa silvestre de *S. Enteritidis*. Se muestra el promedio de 4 o 5 réplicas biológicas ± SE. La significancia estadística se determinó utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas (** = P<0,01 *** = P<0,001).

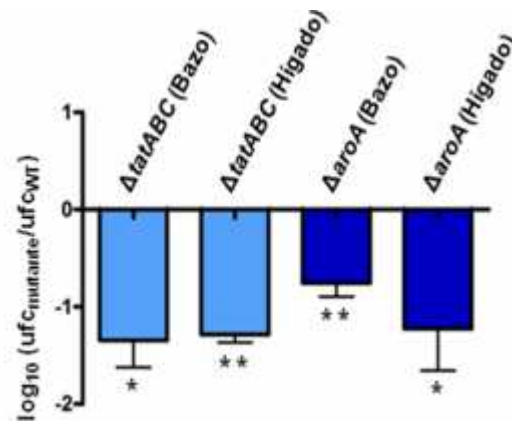


Figura 15 – Ensayo de competencia in vivo entre la cepa silvestre de *S. Typhi* y mutantes *tatABC* y *aroA*. El gráfico muestra los valores de IC expresados como logaritmo en base 10, obtenidos en el experimento de competencia para comparar la capacidad de colonización de órganos internos de ratones BALB/c entre mutantes *tatABC* y *aroA* versus la cepa silvestre de *S. Typhi*. Se muestra el promedio de 3 o 5 réplicas biológicas ± SE. La significancia estadística se determinó utilizando el test estadístico *t* de Student de dos colas (** = P<0,01 * = P<0,05).

Cabe destacar que los ensayos de competencia de *S. Typhi* corresponden a inoculaciones realizadas en ausencia de mucina. Cuando se realizó el mismo experimento en presencia de mucina la mayoría de los ratones inoculados murieron antes de 48 h. Por su parte, cuando se utilizó bacteria resuspendida en PBS no hubo mortalidad de los ratones inoculados. Notablemente, las cantidades de bacterias recuperadas por órgano a partir de inoculaciones en presencia y ausencia de mucina fueron similares, indicando que para este tipo de ensayo no es imprescindible utilizar este vehículo de administración.

Los resultados de los ensayos de competencia muestran que mutantes *tatABC* de los tres serovares estudiados presentan defectos en la colonización sistémica de ratones BALB/c. Este defecto se observa tanto en bazo como en hígado. Además, estos resultados muestran que mutantes en el sistema Tat presentan un grado de atenuación similar al mostrado por mutantes *aroA*. Estas mutantes son incapaces de sintetizar compuestos aromáticos, por lo que su supervivencia dentro de macrófagos se encuentra muy disminuida y las convierte en un buen control de atenuación. En conjunto, estos resultados demuestran la importancia del sistema Tat en la colonización sistémica de ratones BALB/c y además nos permite confirmar la predicción obtenida a partir del análisis masivo de mutantes.

7. Discusión

Los distintos serovares de *S. enterica* presentan diferencias en la especificidad de hospederos que infectan. Los serovares denominados “generalistas” son aquellos capaces de infectar un amplio rango de hospederos animales, incluyendo humanos. A este grupo pertenecen, por ejemplo *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. En el lado opuesto se encuentran los serovares “especialistas”, así llamados por su capacidad de infectar un espectro muy limitado de hospederos, entre los que se encuentran *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que producen una enfermedad sistémica de manera exclusiva en humanos y pollos, respectivamente. Sin embargo, muchos de estos serovares poseen mecanismos comunes de patogenicidad y, más aún, comparten ~80% de su genoma. Esto sugiere que los distintos serovares de *Salmonella* poseen un conjunto común de genes que les permite colonizar un hospedero, de manera independiente de su especificidad de hospedero.

El desarrollo de nuevas herramientas genéticas nos permitió realizar un análisis a gran escala para evaluar los genes necesarios para la colonización sistémica de ratones BALB/c por tres serovares de *Salmonella*. Este tipo de análisis a escala genómica ha sido utilizado en más de 31 especies bacterianas y ha permitido identificar en conjunto más de 1.700 genes relacionados con virulencia (Saenz y Dehio, 2005). Entre las especies estudiadas se encuentran *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Proteus mirabilis*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus* del grupo A y *Staphylococcus aureus*, entre otros. El análisis realizado en esta tesis contribuirá a entender los mecanismos comunes de patogenicidad utilizados por esta especie bacteriana. La estrategia utilizada consistió en analizar genotecas de mutantes que contienen inserciones de transposones al azar en un ambiente selectivo. Las mutantes que posean el transposón inserto en regiones necesarias para su supervivencia en el medio, se perderán de la población debido a un proceso de selección negativa. La posición de los transposones puede ser detectada posteriormente por amplificación del DNA genómico adyacente a la inserción para realizar una hibridación en un *microarray* que represente todos los genes del microorganismo a estudiar, permitiéndonos detectar las mutantes que se pierden bajo selección negativa.

En este trabajo nos propusimos identificar de manera global un conjunto de genes comunes, requeridos para la colonización sistémica de ratones BALB/c por tres serovares de *Salmonella*: dos generalistas (*S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*) y un especialista (*S. Typhi*). En primer lugar realizamos un análisis global de mutantes bajo selección negativa, en una cepa virulenta de *S. Typhi*. Es importante destacar que durante esta tesis se generó un modelo murino de infección sistémica que permite el análisis masivo de mutantes de este serovar, altamente especializado en infectar el ser humano. Generamos una base de datos con predicciones para mutantes en aproximadamente todos los genes no esenciales del genoma de *S. Typhi*. Este análisis indica que mutantes en ~755 genes serían atenuadas *in vivo*. Es necesario hacer notar la dificultad para realizar los ensayos de colonización

sistémica con la genoteca de mutantes y obtener índices de colonización adecuados. Debido a esto, debimos recurrir al uso de diferentes dosis y vehículos para realizar la infección a fin de aumentar los niveles de colonización sistémica observados. Este estudio nos permitió definir que las mejores condiciones para la inoculación de la genoteca corresponden a 10^7 ufc utilizando mucina 5% en PBS como vehículo. Se ha reportado que el uso de mucina promueve la supervivencia de *S. Typhi* dentro de los macrófagos residentes en el espacio peritoneal de ratones BALB/c (Sein et al, 1993). Por otra parte, *S. Typhi* resuspendida en mucina invade y sobrevive más eficientemente en macrófagos J774.3 en cultivo (Sein et al, 1993). Aunque el mecanismo por el cual la mucina ayudaría en estos procesos no ha sido dilucidado, se postula que esta glicoproteína recubriría las bacterias promoviendo su internalización. Además, se piensa que la mucina interferiría con los procesos de digestión intracelular ya que es resistente a la actividad de la mayoría de las proteasas.(Sein et al, 1993).

En esta tesis, el uso de mucina nos permitió obtener índices de colonización sistémica adecuados para realizar el análisis a escala genómica. Sin embargo, aún en estas condiciones observamos una gran variabilidad en los títulos bacterianos según el animal. Por lo tanto, decidimos utilizar únicamente las 3 muestras recuperadas de bazo que presentaban los mayores índices de colonización ($> 5 \cdot 10^5$ ufc/órgano). El modelo de estudio generado nos permitió realizar el análisis masivo de mutantes bajo selección negativa *in vivo*. Las mutantes que se observaron bajo selección negativa en este serovar corresponden a mutantes en genes localizados en islas de patogenicidad (SPI-1, -2, -4, -5, -6, -16), genes relacionados con la

biosíntesis de compuestos aromáticos, genes necesarios para la síntesis de componentes de membrana (LPS, peptidoglicán, proteínas de membrana, etc), además de un gran número de genes que codifican proteínas hipotéticas. Respecto a este tipo de análisis, es importante recalcar que los resultados obtenidos son únicamente predicciones, debido a la naturaleza polar de las mutantes construidas. Cualquier fenotipo interesante deberá ser comprobado mediante análisis de mutantes individuales.

Posteriormente, se realizó un análisis comparativo a fin de identificar el conjunto común de genes requerido para la colonización sistémica de un hospedero murino por los serovares *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Para esto, se utilizó la base de datos con predicciones de *S. Typhi* obtenidas en esta tesis y bases de datos de nuestro laboratorio de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* obtenidas por metodologías similares. Las bases de datos se alinearon y se determinó el conjunto común de mutantes que presentaron deficiencias en la colonización sistémica, según los criterios establecidos en las Secciones 6.3 y 6.4. Como se observa en la **Figura 11**, el conjunto de genes comunes bajo selección negativa comprende aproximadamente a 131 genes. La lista completa de estos genes se muestra en la **Tabla 4** (ver Anexo).

Al realizar el análisis comparativo, se observa la pérdida de mutantes en genes codificados en islas de patogenicidad conservadas. Por ejemplo, se aprecia que prácticamente toda la isla SPI-2 está bajo selección negativa, lo que concuerda con la importancia biológica de esta isla, y del T3SS que codifica, los cuales son

esenciales para la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de células fagocíticas en los tres serovares estudiados (Mastroeni y Maskell, 2005). Además, se observa que, a pesar de haber administrado las bacterias por vía IP, mutantes en genes de la isla SPI-1 también se observan bajo selección negativa. Esto podría explicarse debido a un proceso de recircularización de las bacterias: luego de ser administradas por vía IP, las bacterias colonizan a los órganos internos, incluyendo la vesícula biliar, esta vierte su contenido hacia el intestino y las bacterias son excretadas. Debido a que estos roedores realizan coprofagia, consumiendo entre un 35-60% de sus fecas a pesar de tener una dieta adecuada, las bacterias pueden volver a ser ingeridas pasando nuevamente por el intestino (Suckow et al., 2001) donde las bacterias invaden el epitelio intestinal. Es en este punto en el que ocurriría la selección negativa de estas mutantes.

También se observan bajo selección negativa dos genes codificados en la SPI-4, *STM4258* y *STM4259* (*SEN4027* y *SEN4028* en *S. Enteritidis*; *t4163* y *t4164* en *S. Typhi*). Estos codifican una proteína de membrana putativa y un componente de un transportador de la superfamilia ABC, que sería parte de un sistema de secreción tipo I. Esta isla, que es conservada en el género *Salmonella*, se ha descrito como necesaria para la virulencia por el serovar Typhimurium cuando es administrado por vía oral en ratones BALB/c (Kiss et al., 2007). Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que los genes de esta isla son necesarios para la patogenicidad de *S. Enteritidis* en ratones al ser administrada por vía IP (Silva et al., 2011). Nuestros datos indican que mutantes en al menos algunos de los genes de esta isla son atenuadas *in vivo*, presentan defectos en la colonización sistémica

de ratones BALB/c al ser administrados por vía IP, observación que se repite en los tres serovares estudiados.

Se observa la pérdida de mutantes en genes relacionados con la envoltura celular como los locus *rfa* (*waa*) y *rfb* (*wba*), necesarios para la síntesis del LPS. El LPS corresponde a una de las macromoléculas más abundantes de la membrana externa de bacterias Gram negativo. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el LPS es importante en la interacción entre la bacteria y células eucariontes, mutantes que no sintetizan un LPS completo presentan defectos en la invasión de células epiteliales (Bravo et al., 2010; Chan et al., 2005; Freudenberg et al., 2001; Hensel et al., 1995). Se observa además la pérdida de mutantes en genes necesarios para la síntesis de péptidoglicán (*ampD*, *wecC* y *mdoH*), además de genes que codifican proteínas de membrana externa (*tolC* y *ompA*), todos componentes de las envolturas bacterianas. En el caso del peptidoglicán, es factible que mutantes con defectos en la producción de esta molécula presenten menor supervivencia debido a alteraciones en la membrana. Adicionalmente, se ha descrito que el peptidoglicán modula el ensamblaje del complejo aguja del T3SS (Pucciarelli y Garcia-del Portillo, 2003). La atenuación de mutantes en genes que codifican proteínas de membrana externa se podría explicar debido a que la ausencia de estas proteínas en la membrana produciría un desequilibrio estructural y un cambio en procesos de transporte de solutos y mantención de la osmolaridad, haciendo a las bacterias más susceptibles a factores del medio externo.

Mutantes en genes que codifican reguladores globales asociados a patogenicidad también se encuentran bajo selección negativa, como *phoP*, *envZ*, *rpoN*. PhoP es parte de un sistema de dos componentes (PhoP/PhoQ) que regula la expresión de numerosos genes en respuesta a estímulos externos como baja concentración de Mg^{2+} , entre los genes que regula se encuentran algunos relacionados con patogenicidad (Miller et al., 1989a). Asimismo, EnvZ también es parte de un sistema de dos componentes (EnvZ/OmpR) y se ha descrito que este sistema regula a otro sistema de dos componentes, SsrA/SsrB codificado en la SPI-2, el cual a su vez regula la expresión del T3SS_{SPI-2} al interior de los macrófagos (Lee et al., 2000). Por otra parte, RpoN corresponde a un factor sigma alternativo que controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y con otros procesos fisiológicos como quimiotaxis, metabolismo energético, modificación de RNA y la expresión de otros factores sigma alternativos (Buck et al., 2000), lo que explica la atenuación de estas mutantes.

En este análisis comparativo encontramos genes bajo selección negativa que no se habían asociado previamente con la patogenicidad de los tres serovares de *Salmonella* estudiados. Nos llamó la atención un grupo de genes que codifican las diferentes subunidades de una NADH deshidrogenasa (genes *nuo*). Uno de los genes de este sistema (*nuoG*) ha sido estudiado en los serovares Typhimurium, Dublin y Gallinarum en la modelos de infección aviar y murino (Turner et al., 2003). En dicho estudio no se observó que la mutación en este gen provocara la atenuación significativa en los serovares estudiados, durante la infección oral de ratones. Nuestras observaciones indicarían que estos genes son necesarios para la

colonización sistémica en los tres serovares estudiados luego de la administración IP. Se sabe que mutaciones en estos genes afectan diversos aspectos de la fisiología microbiana, lo que sin duda tiene consecuencias en la virulencia de *Salmonella*. También se observa que algunos genes en el locus *sap* (*sapBF*) se encuentran bajo selección negativa. Este locus codifica un sistema transportador de péptidos del tipo ABC que sólo se ha descrito como necesario para la resistencia a péptidos catiónicos en algunos serovares de *Salmonella* (Parra-Lopez et al., 1994; Rodas et al., 2010). Nuestros datos indican la importancia de estos genes para los tres serovares estudiados durante la infección sistémica en el modelo murino utilizado. Se observan además genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de solutos, como *trkH*, que codifica un transportador de potasio y genes que codificarían proteínas hipotéticas secretadas, como *STM0034* (*SEN0034*, *t0036*) y *STM0478* (*SEN0497*, *t2363*). Todas estas observaciones son novedosas y muestran que no sólo son necesarios genes directamente relacionados con virulencia para la patogenicidad de *Salmonella*. Nos llamó especialmente la atención el operón *tatABC*, que codifica el sistema transportador de proteínas *Twin-Arginine*. Este sistema corresponde a una de las dos vías de transporte de proteínas hacia el espacio periplasmático, cuya importancia será discutida más adelante.

Es interesante mencionar que en un trabajo reciente (Sabbagh et al., 2012) se utilizó una genoteca de transposones en una cepa de *S. Typhi* con el fin de identificar mutantes con defectos en la supervivencia intracelular en una línea celular de macrófagos humanos. En dicho estudio se analizaron mutantes por inserción de un transposón mini-Tn10, las cuales se detectaron mediante

hibridaciones en *microarrays* genómicos utilizando una metodología muy similar a la presentada en esta tesis. Los autores encontraron mutantes en 130 genes bajo selección negativa, entre ellos muchos involucrados en la biogénesis del LPS, fimbrias, flagelo y genes de virulencia, además de genes codificados en islas de patogenicidad (SPI-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -12 y -16). Al comparar los datos de dicho trabajo con los obtenidos en esta tesis, en primer lugar podemos notar que la mayoría de los 130 genes identificados por ellos se encuentran bajo selección negativa *in vivo* en nuestra base de datos de *S. Typhi*. Más aún, algunos de estos genes son necesarios para la colonización sistémica por los tres serovares en estudio, según nuestro análisis comparativo. Sin duda las diferencias metodológicas utilizadas entre ambos trabajos dan cuenta de la diferencia en el número de genes identificados. Esto nos lleva a pensar que todos los genes identificados en el trabajo de Sabbagh et al y que fueron identificados también en nuestro análisis comparativo, están bajo selección negativa *in vivo* debido a que presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos. Como se mencionó en la introducción, la capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos es una de las características más importantes de la patogenicidad de *Salmonella*.

Por otra parte, el análisis comparativo de nuestras tres bases de datos arrojó que solo son necesarios 131 genes en los tres serovares. A nuestro parecer, este es un número pequeño en el que probablemente se está subestimando el número total de genes necesarios para la colonización sistémica por *Salmonella*. Una posible explicación para esto es que algunos genes que se observaron bajo selección negativa en la base de datos de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* corresponden a

genes ausentes en *S. Typhi*. Ejemplo de esto son las islas de patogenicidad SPI-13 y SPI-14, presentes en *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y otros serovares pero ausentes en *S. Typhi*. Otro aspecto que es importante destacar respecto al número de genes identificados corresponde a las limitaciones de la metodología utilizada. Si bien la mutagénesis se realiza utilizando el mismo sistema comercial y el mismo transposón, la cantidad de mutantes por gen y la localización de las inserciones en el genoma, varía en las tres genotecas utilizadas. Además, cada base de datos se analiza por separado, por lo que, de haber mutantes que no están bien muestreadas en todos los experimentos, se observarán atenuadas en algunas de las bases de datos, pero no en el análisis comparativo. Otra limitación a considerar es la metodología utilizada para amplificar el sitio de la inserción del transposón. Durante ese proceso, hay variabilidad en la señal amplificada por cada gen y en cada genoteca, afectando por lo tanto la detección de las mutantes. Idealmente, se busca analizar todos los genes del genoma en los tres serovares con un número similar de mutantes por gen. Sin embargo, debido a estas mismas limitaciones de la metodología empleada, aquellas observaciones que se repitan en los tres serovares constituyen datos muy robustos. Las mutantes que se observan bajo selección negativa en los tres serovares difícilmente corresponden a falsos positivos y es altamente probable que dichos genes estén involucrados en la capacidad de *Salmonella* de colonizar un hospedero.

Por último, debido a la naturaleza polar de las mutaciones por inserción de un transposón, es necesario verificar al menos algunas de las observaciones obtenidas en las bases de datos generadas. Se escogió el operón *tatABC* para

comprobar el fenotipo observado durante el análisis global de mutantes. Este operón codifica el sistema de transporte de proteínas *Twin-Arginine*, que es uno de los dos mecanismos utilizados por las bacterias Gram negativo para el transporte de proteínas al periplasma. Existen dos vías principales para el transporte de proteínas hacia el periplasma: la vía Sec (*Secretion pathway*) y la vía Tat (*Twin-Arginine translocation pathway*). Si bien el sistema Tat no es universalmente conservado como el sistema Sec, se ha encontrado en numerosas bacterias, arqueas e incluso cloroplastos de algunas plantas (De Buck et al., 2008). Las principales diferencias entre ambos sistemas radican en que el sistema Sec transporta proteínas desplegadas, mientras que el sistema Tat permite la translocación de proteínas plegadas y unidas a co-factores metálicos (no disponibles en el espacio periplasmático) e incluso complejos oligoméricos (Palmer y Berks, 2012).

La **Figura 16** muestra el modelo aceptado de translocación de proteínas mediado por el sistema Tat en *E. coli*. Como se muestra, la capacidad de transportar complejos multiproteicos o proteínas plegadas y unidas a co-factores metálicos estaría dada por la oligomerización de TatA una vez que el complejo TatBC ha reconocido el sustrato a transportar. Esto permitiría generar el canal de paso sólo en el momento necesario y desarmarlo cuando no está en uso, evitando de esta manera perder la permeabilidad de la membrana plasmática debido a la presencia de un canal de gran tamaño de manera permanente.

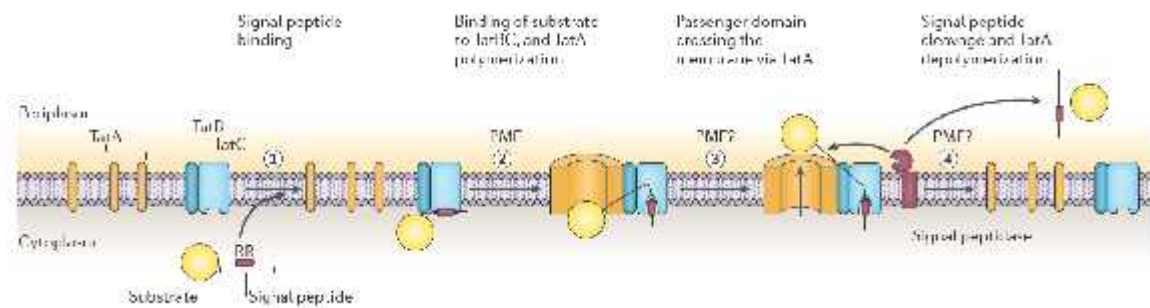


Figura 16 – Modelo de ciclo de translocación del sistema Tat en E. coli. Se muestran los pasos que siguen los sustratos de sistema Tat para ser transportados hacia el periplasma. En primer lugar, el complejo TatBC reconoce el péptido-síñal del sustrato y lo ancla a la membrana. Esto recluta al componente TatA que multimeriza para formar un poro por el cual es transportado el sustrato. Una vez que éste ha sido transportado, se corta el péptido síñal por una proteasa desconocida (Palmer y Berks, 2012).

Este sistema reconoce un péptido-síñal en la región N-terminal de la proteína que posee un motivo característico de dos argininas vecinas, lo que le da el nombre al sistema. En la **Figura 17** se muestran los péptidos-síñal de la vía Sec y Tat, además del sitio de corte de la proteasa que elimina el péptido-síñal una vez que la proteína ha sido translocada.

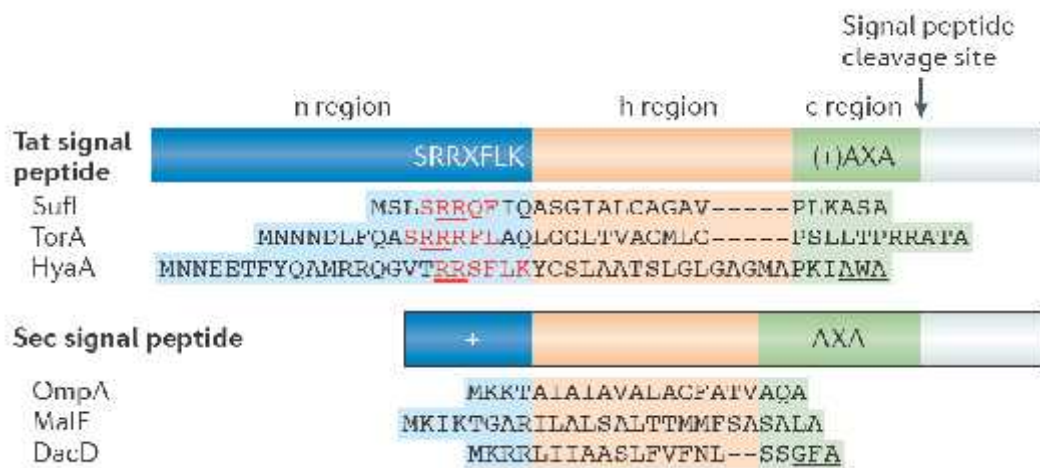


Figura 17 – Comparación de las secuencias del péptido-síñal de sustratos de los sistemas de secreción Tat y Sec. Se muestran las secuencias de algunos sustratos de los sistemas Tat y Sec. Adaptado de Palmer, 2012.

Debido a que identificamos que mutantes en este sistema presentan defectos importantes en la capacidad de colonizar ratones sistémicamente, analizamos la posibilidad de que algunas de las proteínas, clasificadas como proteínas secretables en la base de datos y que se observan bajo selección negativa en los tres serovares, fueran sustratos de la vía Tat. Para este análisis se utilizó la plataforma TatFind (Bendtsen et al., 2005), que permite buscar la presencia del péptido señal en la secuencia aminoacídica de la proteína, permitiéndonos predecir si es un sustrato de esta vía. Mediante este análisis no detectamos la presencia del péptido señal de la vía Tat en las proteínas secretadas codificadas en los genes *SEN0034*, *SEN0329*, *SEN0478*, *SEN0935*, *SEN0991*, *SEN1341*, *SEN1420* ni *SEN2784*. Esto nos hace pensar que el fenotipo atenuado que se observa al mutar el sistema Tat no se debe a la ausencia en el periplasma de una de las proteínas secretadas a través de esta vía, sino a la falta de un conjunto de

diferentes proteínas secretadas por este sistema. Está reportado que los sustratos de la vía Tat están involucrados en procesos tan fundamentales como el metabolismo respiratorio, adquisición de hierro y fosfato, división celular, movilidad celular, *quorum sensing*, resistencia a metales y péptidos antimicrobianos (Palmer y Berks, 2012), por lo que es razonable pensar que la ausencia de un conjunto de proteínas involucradas en estos procesos sea la causal de la atenuación observada para estas mutantes. Además, es importante destacar que este sistema se ha identificado como necesario para la virulencia de prácticamente todos los microorganismos en que se ha estudiado (De Buck et al., 2008). Por otra parte, nuestros datos de selección negativa en los tres serovares indican que este sistema es importante para la colonización sistémica de un hospedero murino. Estas observaciones se corroboraron mediante ensayos de competencia *in vivo*.

Los resultados de nuestros ensayos de competencia *in vivo* demuestran la importancia de este sistema en la patogenicidad de *Salmonella*. Más aún, un trabajo reciente de nuestros colaboradores mostró que mutantes *tatC* son atenuadas *in vivo* en ensayos realizados en ratones BALB/c (Reynolds et al., 2011). Ellos obtuvieron valores de índices de competencia para *S. Typhimurium* muy similares a los nuestros. Además, observaron que estas mutantes presentan deficiencias en la sobrevivencia al interior de macrófagos murinos y menor resistencia a sales biliares (Reynolds et al., 2011). Esto también se ha visto en otras bacterias (Kassem et al., 2011; Robinson et al., 2010) en que se ha demostrado que mutantes en componentes del sistema Tat presentan una susceptibilidad aumentada ante detergentes y a estrés osmótico.

Cuando una mutante presenta defectos en la colonización sistémica se deben realizar ensayos de complementación en los que se devuelve una copia intacta del gen a la cepa mutante para recuperar el fenotipo silvestre. Este ensayo permite asociar directamente la funcionalidad del gen en estudio con el fenotipo observado inicialmente. En vista de esto, en esta tesis se había propuesto originalmente complementar la mutante *tatABC* de *S. Typhi*. Sin embargo, durante la clonación del operón *tatABC* en un vector de bajo número de copias no se obtuvieron transformantes que presentaran el inserto correcto. Esto podría deberse a que el vector utilizado contiene el promotor P_{lac} pero carece del gen que codifica el represor *Lacl*, lo que causa la sobreexpresión de los genes que quedan bajo su control en bacterias del género *Salmonella*. De esta forma, clonar genes que codifican proteínas de membrana en este vector lo vuelve un plasmidio altamente tóxico para la bacteria. Debido a estos motivos, decidimos no incluir los ensayos de complementación en esta tesis. Actualmente estamos trabajando en clonar el operón *tatABC* de *S. Typhi* en otro vector, el cual ha sido utilizado por un grupo de colaboradores para clonar exitosamente proteínas de membrana en *Salmonella*.

Finalmente, en esta tesis se realizó un análisis a escala genómica para identificar los genes involucrados en la colonización sistémica de un hospedero murino. Esta estrategia experimental nos permitió obtener predicciones para todos los genes no esenciales del genoma de tres serovares de *S. enterica*, dos de amplio rango de hospedero y uno de hospedero restringido, permitiéndonos determinar un conjunto común de genes requeridos para colonizar eficientemente un hospedero murino. Se comprobó el fenotipo de una de las regiones genómicas identificadas, el

operón *tatABC*, y los resultados comprueban la necesidad del sistema Tat para la colonización sistémica de un hospedero. Esto valida la predicción obtenida a partir de nuestras hibridaciones comparativas en *microarrays* genómicos y demuestra la importancia de este sistema en la patogenicidad de *Salmonella*.

Este trabajo ha aportado información valiosa respecto a los genes necesarios para la infección sistémica producida por *Salmonella*, siendo además el primer trabajo en que se ha realizado un estudio comparativo entre tres serovares de este género. El análisis de los datos generados en este trabajo permitirá definir nuevos mecanismos comunes de patogenicidad. Eventualmente, el conocimiento generado permitirá la generación de nuevas vacunas vivas atenuadas y/o terapias para prevenir o tratar infecciones causadas por diferentes serovares de *Salmonella*.

8. Conclusiones

- Generamos un modelo de colonización sistémica aguda de ratones BALB/c, utilizando una genoteca de mutantes representativa del genoma de *S. Typhi*. Este modelo nos permitió realizar el análisis de mutantes bajo selección negativa *in vivo*.
- Identificamos de manera global los genes de *S. Typhi* necesarios para la colonización sistémica de ratones BALB/c.
- Dentro de los genes identificados se encuentran algunos codificados en islas de patogenicidad, genes necesarios para la síntesis y modificación del LPS, genes que codifican reguladores globales, genes metabólicos y genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de proteínas y otros solutos.
- Identificamos un conjunto común de 131 genes necesarios para la colonización sistémica de un hospedero murino por *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*.
- En ensayos de competencia *in vivo*, mutantes del operón *tatABC* presentan defectos en la colonización sistémica en los tres serovares estudiados. Estos resultados validan la predicción obtenida mediante el análisis global y demuestran la importancia de este sistema de transporte de proteínas en la patogenicidad de *Salmonella*.

9. Referencias

- Amavisit, P.**, Lightfoot, D., Browning, G.F., y Markham, P.F. (2003). Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* 185, 3624-3635.
- Andrews-Polymenis, H.L.**, Rabsch, W., Porwollik, S., McClelland, M., Rosetti, C., Adams, L.G., y Baumler, A.J. (2004). Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium pigeon isolates does not correlate with loss of discrete genes. *J Bacteriol* 186, 2619-2628.
- Bar-Meir, M.**, Raveh, D., Yinnon, A.M., Benenson, S., Rudensky, B., y Schlesinger, Y. (2005). Non-Typhi *Salmonella* gastroenteritis in children presenting to the emergency department: characteristics of patients with associated bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 11, 651-655.
- Bäumler, A.J.**, Kusters, J.G., Stojiljkovic, I., y Heffron, F. (1994). *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* 62, 1623-1630.
- Bearson, B.L.**, Wilson, L., y Foster, J.W. (1998). A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180, 2409-2417.
- Bendtsen, J.D.**, Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., y Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6, 167.
- Blanc-Potard, A.B.**, y Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 16, 5376-5385.
- Blanc-Potard, A.B.**, Solomon, F., Kayser, J., y Groisman, E.A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 181, 998-1004.
- Bogomolnaya, L.M.**, Santiviago, C.A., Yang, H.J., Baumler, A.J., y H.L., Andrews-Polymenis. (2008). 'Form Variation' of the O12 Antigen is Critical for Persistence of *Salmonella* Typhimurium in the Murine Intestine. *Molecular Microbiology* 70, 1105-1119.
- Bravo, D.**, Hoare, A., Silipo, A., Valenzuela, C., Salinas, C., Alvarez, S.A., Molinaro, A., Valvano, M.A., y Contreras, I. (2010). Different sugar residues of the lipopolysaccharide outer core are required for early interactions of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium with epithelial cells. *Microb Pathog* 50, 70-80.
- Brent, A.J.**, Oundo, J.O., Mwangi, I., Ochola, L., Lowe, B., y Berkley, J.A. (2006). *Salmonella* bacteremia in Kenyan children. *Pediatr Infect Dis J* 25, 230-236.

Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., y Gralla, J.D. (2000). The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* 182, 4129-4136.

Bueno, S.M., Santiviago, C.A., Murillo, A.A., Fuentes, J.A., Trombert, A.N., Rodas, P.I., Youderian, P., Mora, G.C. (2004). Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 186, 3202-3213.

CDC (2005). *Salmonella* Annual Summary 2005 (Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute of Infectious Diseases).

Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30, 175-188.

Chan, K., Kim, C.C., Falkow, S. (2005). Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 73, 5438-5449.

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.

De Buck, E., Lammertyn, E., Anne, J. (2008). The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol* 16, 442-453.

Edwards, R.A., Olsen, G.J., Maloy, S.R. (2002). Comparative genomics of closely related *salmonellae*. *Trends Microbiol* 10, 94-99.

Freudenberg, M.A., Merlin, T., Gumenscheimer, M., Kalis, C., Landmann, R., Galanos, C. (2001). Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect* 3, 1213-1222.

Galán, J.E., Curtiss III, R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6383-6387.

Galán, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* 174, 4338-4349.

Gerlach, R.G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D., Hensel, M. (2007). *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9, 1834-1850.

Graham, S.M. (2002). Salmonellosis in children in developing and developed countries and populations. *Curr Opin Infect Dis* 15, 507-512.

Graham, S.M., Walsh, A.L., Molyneux, E.M., Phiri, A.J., and Molyneux, M.E. (2000). Clinical presentation of non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia in Malawian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 310-314.

- Guard-Petter, J. (2001).** The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* 3, 421-430.
- Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M., Miller, S.I. (2000).** A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 182, 4077-4086.
- Gulig, P.A., Doyle, T.J. (1993).** The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of *Salmonellae* in mice. *Infect immun* 61, 504-511.
- Gunn, J.S., Miller, S.I. (1996).** PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178, 6857-6864.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I. (2008).** *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* 6, 53-66.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., Galan, J.E. (1998).** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815-826.
- Hensel, M., Shea, J.E., Bäumlner, A.J., Gleeson, C., Blattner, F., Holden, D.W. (1997).** Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179, 1105-1111.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W. (1995).** Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269, 400-403.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C., Holden, D.W. (1998).** Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30, 163-174.
- House, D., Bishop, A., Parry, C., Dougan, G., Wain, J. (2001).** Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis* 14, 573-578.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E.A., Ochman, H. (2010).** Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol* 192, 560-567.
- Kassem, II, Zhang, Q., Rajashekara, G. (2011).** The twin-arginine translocation system: contributions to the pathobiology of *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiol* 6, 1315-1327.
- Kiss, T., Morgan, E., Nagy, G. (2007).** Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 275, 153-159.
- Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., Monack, D.M. (2006).** Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2, e11.

- Lee, A.K.**, Detweiler, C.S., Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182, 771-781.
- Mastroeni, P.**, Maskell, D., (2005). “*Salmonella*” Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects (Published by Cambridge University Press).
- Miller, I.**, Maskell, D., Hormaeche, C., Johnson, K., Pickard, D., Dougan, G. (1989a). Isolation of orally attenuated *Salmonella typhimurium* following TnpHoA mutagenesis. *Infect Immun* 57, 2758-2763.
- Miller, S.I.**, Kukral, A.M., Mekalanos, J.J. (1989b). A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5054-5058.
- Ochman, H.**, Groisman, E.A. (1996). Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 64, 5410-5412.
- Palmer, T.**, Berks, B.C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10, 483-496.
- Parker, C.T.**, Liebana, E., Henzler, D.J., Guard-Petter, J. (2001). Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ Microbiol* 3, 332-342.
- Parkhill, J.**, Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., et al. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413, 848-852.
- Parra-Lopez, C.**, Lin, R., Aspedon, A., Groisman, E.A. (1994). A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *EMBO J* 13, 3964-3972.
- Patel, J.C.**, Galan, J.E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* 175, 453-463.
- Popoff, M.Y.** (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur, Paris, France.
- Popoff, M.Y.**, Bockemuhl, J., Gheesling, L.L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155, 568-570.
- Pucciarelli, M.G.**, Garcia-del Portillo, F. (2003). Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. *Mol Microbiol* 48, 573-585.
- Raffatellu, M.**, Chessa, D., Wilson, R.P., Tukel, C., Akcelik, M., Baumler, A.J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74, 19-27.
- Rappl, C.**, Deiwick, J., Hensel, M. (2003). Acidic pH is required for the functional assembly of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *FEMS Microbiol Lett* 226, 363-372.

- Reynolds, M.M.**, Bogomolnaya, L., Guo, J., Aldrich, L., Bokhari, D., Santiviago, C.A., McClelland, M., Andrews-Polymenis, H. (2011). Abrogation of the twin arginine transport system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium leads to colonization defects during infection. PLoS One 6, e15800.
- Robinson, C.**, Matos, C.F., Beck, D., Ren, C., Lawrence, J., Vasisht, N., Mendel, S. (2010). Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. Biochim Biophys Acta 1808, 876-884.
- Rodas, P.I.**, Contreras, I., Mora, G.C. (2010). *Salmonella enterica* serovar Typhi has a 4.1 kb genetic island inserted within the *sapABCDF* operon that causes loss of resistance to the antimicrobial peptide protamine. J Antimicrob Chemother 65, 1624-1630.
- Sabbagh, S.C.**, Lepage, C., McClelland, M., Daigle, F. (2012). Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. PLoS One 7, e36643.
- Saenz, H.L.**, Dehio, C. (2005). Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. Curr Opin Microbiol. 2005 Oct;8(5):612-619.
- Sein, J.**, Cachicas, V., Becker, M.I., De Ioannes, A.E. (1993). Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol Res. 1993;26(3):371-379.
- Shimoni, Z.**, Pitlik, S., Leibovici, L., Samra, Z., Konigsberger, H., Drucker, M., Agmon, V., Ashkenazi, S., Weinberger, M. (1999). Nontyphoid *Salmonella* bacteremia: age-related differences in clinical presentation, bacteriology, and outcome. Clin Infect Dis 28, 822-827.
- Silva, C.A.**, Blondel, C.J., Quezada, C.P., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H.L., Toro, C.S., Zaldivar, M., Contreras, I., McClelland, M., Santiviago, C.A. (2011). Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. Infect Immun 80, 839-849.
- Sockett, P.N.** (1991). The economic implications of human *Salmonella* infection. J Appl Bacteriol 71, 289-295.
- Suckow, M.**, Danneman, P., Brayton, C. (2001). The Laboratory Mouse: Behavior, anatomic and physiologic features, normative values, hematology. Chapter 1, pages 14-21 (London New York Washington DC, Press Boca Raton).
- Thomson, N.R.**, Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., et al. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. Genome Res 18, 1624-1637.

Turner, A.K., Barber, L.Z., Wigley, P., Muhammad, S., Jones, M.A., Lovell, M.A., Hulme, S., and Barrow, P.A. (2003). Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. *Infect Immun* 71, 3392-3401.

Wain, J., House, D., Parkhill, J., Parry, C., and Dougan, G. (2002). Unlocking the genome of the human typhoid bacillus. *Lancet Infect Dis* 2, 163-170.

Waterman, S.R., and Holden, D.W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 5, 501-511.

Wetter, M., Goulding, D., Pickard, D., Kowarik, M., Waechter, C.J., Dougan, G., and Wacker, M. (2012). Molecular characterization of the *viaB* locus encoding the biosynthetic machinery for Vi capsule formation in *Salmonella* Typhi. *PLoS One* 7, e45609.

Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thurston, S.J., and Saffer, J.D. (1998). Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infect Immun* 66, 3365-3371.

Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 29, 883-891.

10. Anexo

Tabla 4 – lista de genes comunes a *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, requeridos para la colonización sistémica de un hospedero murino.

Isla Genómica	Anotación S.Enteritidis NCTC13349	Anotación S.Typhimurium LT2	Anotación S.Typhi Ty2	Gen	Producto
	SEN0019	STM0020	t0021		conserved hypothetical protein
	SEN0034	STM0034	t0036		putative exported protein
	SEN0039	STM0039	t0041	nhaA	Na(+)/H(+) antiporter 1
	SEN0067	STM0067	t0068	carB	carbamoyl-phosphate synthase large chain
	SEN0119	STM0118	t0122	fruR	fructose repressor
	SEN0195	STM0190	t0198	mrcB	penicillin-binding protein 1b; peptidoglycan synthetase
	SEN0214	STM0209	t0210	htrA	protease DO precursor; heat shock protein HtrA
	SEN0329	STM0346	t2515		possible outer membrane protein
	SEN0443	STM0461	t2398	mdlB	putative ABC transporter ATP-binding membrane protein
SPI-16	SEN0535	STM0557	t2304		putative membrane protein
	SEN0575	STM0606	t2262	ybdO	putative lysR-family transcriptional regulator
	SEN0646	STM0682	t2193	nagC	N-acetylglucosamine repressor
	SEN0647	STM0683	t2192	nagA	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
	SEN0684	STM0734	t2142	sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
	SEN0698	STM0748	t2128	tolB	tolB protein precursor
	SEN0862	STM0958	t1976	trxB	thioredoxin reductase
	SEN0881	STM0977	t1957	serC	phosphoserine aminotransferase
	SEN0935	STM1070	t1850	ompA	outer membrane protein A
	SEN0991	STM1130	t1790		exported protein
	SEN1115	STM1888	t0989	pykA	pyruvate kinase A
	SEN1223	STM1814	t1063	minC	septum site-determining protein
	SEN1284	STM1752	t1663	galU	glucose-1-phosphate uridylyltransferase
	SEN1337	STM1696	t1610	sapF	peptide transport system ATP-binding protein SapF
	SEN1340	STM1693	t1598	sapB	peptide transport system permease protein SapB
ROD-14	SEN1508	STM1544	t1463	pqaA	conserved hypothetical protein, phoPQ-regulated
	SEN1582	STM1467	t1335	manA	mannose-6-phosphate isomerase
SPI-2	SEN1627	STM1418	t1286	ssaQ	putative type III secretion protein
SPI-2	SEN1631	STM1414	t1282	ssaV	putative type III secretion protein
SPI-2	SEN1632	STM1413	t1281	ssaM	putative pathogenicity island protein
SPI-2	SEN1633	STM1412	t1280	ssaL	putative secretion system protein
SPI-2	SEN1634	STM1411	t1279	ssaK	putative pathogenicity island protein
SPI-2	SEN1635	STM1410	t1278		putative pathogenicity island protein
SPI-2	SEN1645	STM1400	t1268	sseC	putative pathogenicity island effector protein
SPI-2	SEN1647	STM1398	t1266	sseB	putative pathogenicity island effector effector protein
SPI-2	SEN1650	STM1395	t1263	ssaD	putative pathogenicity island protein
SPI-2	SEN1651	STM1394	t1262	ssaC	putative outer membrane secretory protein
SPI-2	SEN1653	STM1392	t1260	ssrA	putative two-component sensor kinase
SPI-2	SEN1653	STM1392	t1260	ssrA	putative two-component sensor kinase

Isla Genómica	Anotación S.Enteritidis NCTC13349	Anotación S.Typhimurium LT2	Anotación S.Typhi Ty2	Gen	Producto
SPI-2	SEN1664	STM1381	t1249	orf245	Orf 245 protein
	SEN1667	STM1378	t1246	pykF	pyruvate kinase
	SEN1728	STM1315	t1194	celD	putative cel operon repressor
	SEN1818	STM1231	t1689	phoP	transcriptional regulatory protein PhoP, regulator of virulence determinants
	SEN1838	STM1211	t1709	ndh	NADH dehydrogenase
	SEN1859	STM1190	t1730	yceD	conserved hypothetical protein
	SEN2082	STM2083	t0790	rfbK	phosphomannomutase
	SEN2083	STM2084	t0789	rfbM	mannose-1-phosphate guanylyltransferase
	SEN2086	STM2090	t0782	rfbH	putative dehydratase RfbH
	SEN2088	STM2092	t0780	rfbF	glucose-1-phosphate cytidylyltransferase
	SEN2089	STM2093	t0779	rfbI	putative reductase RfbI
	SEN2134	STM2139	t0718		putative membrane protein
	SEN2190	STM2197	t0658		putative hydrolase
	SEN2221	STM2228	t0626	yejM	putative sulphatase
	SEN2299	STM2317	t0547	nuoM	NADH dehydrogenase I chain M
	SEN2300	STM2318	t0546	nuoL	NADH dehydrogenase I chain L
	SEN2303	STM2321	t0543	nuoI	NADH dehydrogenase I chain I
	SEN2306	STM2324	t0540	nuoF	NADH dehydrogenase I chain F
	SEN2308	STM2326	t0538	nuoC	NADH dehydrogenase I chain C; chain D
	SEN2338	STM2356	t0508	ubiX	putative decarboxylase
	SEN2344	STM2362	t0502	purF	amidophosphoribosyltransferase
	SEN2351	STM2369	t0495	usg	putative semialdehyde dehydrogenase
	SEN2369	STM2387	t0477	sixA	phosphohistidine phosphatase
	SEN2413	STM2432	t0425	ptsl	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ec 2.7.3.9) (phosphotransferase system, enzyme i)
	SEN2443	STM2463	t0395	eutE	putative aldehyde dehydrogenase
	SEN2480	STM2499.S	t0358	purM	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
	SEN2491	STM2511	t0346	guaB	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
	SEN2521	STM2541	t0315	yfhF	conserved hypothetical protein
	SEN2523	STM2543	t0313	nifS	Cysteine desulfurase
	SEN2523	STM2543	t0313	nifS	Cysteine desulfurase
	SEN2554	STM2574	t0283		putative transmembrane transport protein
	SEN2563	STM2583	t0274	lepA	GTP-binding protein lepA.
	SEN2570	STM2643	t0267	srmB	ATP-dependent RNA helicase SrmB
SEN2608	STM2688	t2642	smpB	SsrA (tmRNA)-binding protein	
SPI-1	SEN2711	STM2869	t2771	orgA	cell invasion protein
SPI-1	SEN2724	STM2883	t2785	sipD	pathogenicity island 1 effector protein
SPI-1	SEN2728	STM2887	t2789	spaS	secretory protein (associated with virulence)
SPI-1	SEN2729	STM2888	t2790	spaR	secretory protein (associated with virulence)
SPI-1	SEN2732	STM2891	t2793	spaO	associated with type III secretion and virulence
SPI-1	SEN2733	STM2892	t2794	invJ	associated with type III secretion and virulence
SPI-1	SEN2735	STM2894	t2796	invC	secretory apparatus ATP synthase (associated with virulence)
SPI-1	SEN2738	STM2897	t2799	invE	cell invasion protein
SPI-1	SEN2739	STM2898	t2800	invG	secretory protein (associated with virulence)
SPI-1	SEN2741	STM2900	t2802	invH	cell adherence/invasion protein
	SEN2838	STM2996	t2904	recC	exonuclease V subunit
	SEN2887	STM3044	t2962	xerD	site-specific integrase/recombinase

Isla Genómica	Anotación S.Enteritidis NCTC13349	Anotación S.Typhimurium LT2	Anotación S.Typhi Ty2	Gen	Producto
	SEN2899	STM3056	t2974	visC	possible monooxygenase
	SEN2919	STM3076	t2996	tktA	transketolase
	SEN2947	STM3104	t3016	yggW	possible oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
	SEN2981	STM3138	t3059		hypothetical protein
	SEN3029	STM3186	t3107	tolC	outer membrane protein TolC precursor
	SEN3117	STM3282	t3200	pnp	polynucleotide phosphorylase
	SEN3153	STM3320	t3237	rpoN	RNA polymerase sigma-54 factor (sigma-N)
	SEN3203	STM3370	t3285	cafA	ribonuclease G
	SEN3229	STM3401	t4103	aroE	shikimate dehydrogenase
	SEN3273	STM3445	t3481		elongation factor Tu
	SEN3310	STM3484	t4022	dam	DNA adenine methylase
	SEN3312	STM3486	t4020	aroB	3-dehydroquinate synthase
	SEN3327	STM3501	t4005	envZ	two-component sensor kinase EnvZ
	SEN3370	STM3547.Sc	t3974		putative kinase/transcriptional regulatory protein
	SEN3376	STM3553	t3968	ugpQ	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
	SEN3412	STM3589	t3927	pitA	putative low-affinity inorganic phosphate transporter
	SEN3438	STM3615	t3902	yhjK	conserved hypothetical protein
	SEN3508	STM3686	t3833	mtlD	mannitol-1-phosphate dehydrogenase
	SEN3512	STM3690	t3829		putative lipoprotein
	SEN3521	STM3699	t3820	cysE	serine acetyltransferase
	SEN3536	STM3714	t3805	rfaK	LPS 1,2-n-acetylglucosaminettransferase (ec 2.4.1.56)
	SEN3540	STM3718	t3801	rfal	LPS 1,3-galactosyltransferase
	SEN3541	STM3719	t3800	rfaB	LPS 1,6-galactosyltransferase
	SEN3543	STM3721	t3797	rfaP	LPS core biosynthesis protein
	SEN3544	STM3722	t3796	rfaG	LPS core biosynthesis protein
	SEN3545	STM3723	t3795	rfaQ	LPS core biosynthesis protein
	SEN3565	STM3743	t3775	spoU	tRNA (guanosine-2'-O)-methyltransferase
	SEN3567	STM3746	t3773	gltS	glutamate permease
	SEN3660	STM3843	t3677	trmE	thiophene and furan oxidation protein
	SEN3669	STM3855	t3668	pstA	phosphate transport system permease protein
	SEN3674	STM3860	t3663		conserved hypothetical protein
	SEN3716	STM3910	t3388	ppiC	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C
	SEN3726	STM3921	t3376	wecC	UDP-ManNAc dehydrogenase
	SEN3769	STM3974	t3323	tatB	sec-independent protein translocase protein
	SEN3770	STM3975	t3322	tatC	sec-independent protein translocase protein
	SEN3774	STM3979	t3318	ubiB	flavin reductase
	SEN3780	STM3986	t3312	trkH	trk system potassium uptake protein
	SEN3852	STM4062	t3557	pfkA	6-phosphofructokinase
	SEN3889	STM4099	t3519	metJ	repressor of the methionine regulon
	SEN3920	STM4126	t3499	udhA	possible pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
	SEN3951	STM4165	t3466	rsd	putative regulatory protein
	SEN3961	STM4175	t3456	purD	phosphoribosylglycineamide synthetase
	SEN3962	STM4176	t3455	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase and IMP cyclohydrolase
SPI-4	SEN4027	STM4258	t4163		putative integral membrane protein
	SEN4130	STM4363	t4414	hflK	HflK protein
	SEN4216	STM4465	t4499		ornithine carbamoyltransferase