

UCH-FC
DOC-B
T 686
C.L

**TRANSFERENCIA DE GENES ENTRE BACTERIAS
RELACIONADAS MEDIANTE ELECTROTRANSFORMACIÓN.
APLICACIÓN EN LA CARACTERIZACIÓN GÉNÉTICA DE
MUTANTES DE *Salmonella typhi* CON DEFECTOS EN LA
CAPACIDAD DE INVADIR CÉLULAS EPITELIALES**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología y
submención Microbiología**



FACULTAD DE CIENCIAS

por

CECILIA SHIRLEY TORO UGALDE

Septiembre, 1998

Director de Tesis: Dr. Guido C. Mora Longa

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

CECILIA SHIRLEY TORO UGALDE

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Julio de 1998.

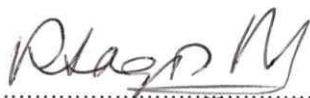
Director de Tesis
Dr. Guido Mora L.



.....


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos



.....

Dra. Margarita Carú




.....

Dr. David Holmes

David S. Holmes

Dr. Carlos Jerez



.....



Con todo mi cariño y agradecimiento, a mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron y me acompañaron durante el desarrollo de esta Tesis.

Especialmente al Dr. Guido Mora, mi tutor y amigo, que me recibió en su laboratorio y me guió no sólo en los quehaceres de la investigación, sino también en los momentos difíciles de la vida diaria.

A la Dra. Nara Figueroa-Bossi y al Dr. Lionello Bossi, por su valiosa cooperación y por acogerme en su laboratorio en el Centro de Genética Molecular, CNRS, Gif sur Yvette, Francia.

Al Dr. Stanley Maloy, que me brindó su generosa ayuda y sabiduría, durante mi estadía en el laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Microbiología, Universidad de Illinois, EEUU.

A mis amigos de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, con quienes viví inolvidables años de trabajo y entretenimiento. Entre ellos el Dr. Manuel Rodríguez, Inés Contreras, Luz Pámela Blanco, Nancy Maulén, Valeria Matus, Jorge Delgado, Gonzalo Troncoso, Alonso Puga, Víctor Ahumada, Orlando Ortíz, José Peña y María Angélica Espinoza.

A Carlos Santiviago, o Cliff para los amigos, quien además de compartir largas jornadas de trabajo en el laboratorio, discusión de papers y muchos ensayos de β -galactosidasa, estuvo conmigo en los momentos más críticos de esta etapa, como la edición de la tesis.

A la familia Zerón Rodríguez, que me recibió cariñosamente en su hogar, durante mi estadía en Francia.

A mi familia, que siempre me apoya y me quiere.

Finalmente, quiero agradecer a quienes dieron el apoyo financiero que hizo posible este trabajo: proyecto FONDECYT 1960255 del Dr. Guido Mora; proyecto ECOS/CONICYT C94B06; mi proyecto para Tesis de Doctorado FONDECYT 2970029 y la beca PG-094-102 de la Vicerrectoría Académica, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
Genética del proceso de invasión en <i>Salmonella</i>	5
Regulación del fenotipo invasor	11
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Material Biológico.....	17
1.1 Cepas bacterianas.....	17
1.2. Plasmidios.....	20
1.3. Bacteriófagos.....	20
2. Medios de cultivo bacteriano.....	21
3. Condiciones de cultivo bacteriano.....	22
4. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	22
5. Ensayo de invasión a la línea celular epitelial HEp-2.....	23
6. Determinación de actividad β -galactosidasa.....	24
7. Técnicas genéticas.....	25
7.1. Preparación de lisados.....	25
7.1.1. Preparación de lisados P22 HT <i>int</i>	25

7.1.2. Preparación de lisados MudP22.....	26
7.2. Transducciones.....	26
7.3. Localización de las mutaciones en el cromosoma de <i>S. typhimurium</i>	27
7.4. Reemplazo de MudJ por MudP22.....	28
8. Técnicas moleculares.....	29
8.1. Obtención de DNA plasmidial.....	29
8.2. Obtención de DNA cromosomal.....	30
8.3. Obtención de DNA de fagos.....	31
8.4. Electroporación.....	32
8.5 Análisis de hibridación mediante Southern blot.....	33
8.5.1. Southern blot radiactivo.....	33
8.5.2. Southern blot no-radiactivo.....	34
8.6. Secuenciación.....	35
8.7. Reacciones de amplificación por PCR.....	36
RESULTADOS.....	37
1. Desarrollo de un método de transferencia de marcadores cromosomales desde <i>S. typhi</i> a <i>S. typhimurium</i>	37
1.1. Transformación de <i>S. typhimurium</i> con DNA plasmidial lineal.....	37
1.2. Transformación de <i>S. typhimurium</i> con DNA cromosomal.....	41
1.2.1. Transformación con DNA homólogo, de <i>S. typhimurium</i>	41
1.2.2. Transformación con DNA heterólogo, de <i>S. typhi</i>	43
1.3. Transformación con DNA de mutantes de <i>S. typhi</i>	44
1.4. Análisis del marcador <i>leuA::MudJ</i> mediante hibridación Southern.....	49
1.5. Eficiencia de transformación en mutantes del sistema de restricción <i>hsd</i>	50
1.6. Localización de la mutación en cepas auxotróficas de <i>S. typhi</i>	50
1.7. Transformación usando cepas de <i>S. typhi</i> como receptora.....	54
2. Caracterización del fenotipo invasor de <i>S. typhi</i> a la línea celular HEP-2.....	56
2.1. Caracterización del fenotipo invasor de <i>S. typhi</i> silvestre.....	56
2.2. Caracterización de mutantes de <i>S. typhi</i> defectuosas en invasión.....	60

2.3. Caracterización de las mutantes defectuosas en invasión después “del backcross”	63
2.3.1. Análisis mediante Southern blot.....	63
2.3.2. Análisis del fenotipo de las mutantes.....	66
2.4. Localización cromosomal de la mutación en cepas de <i>S. typhi</i> defectuosas en invasión a células epiteliales.....	70
3. Caracterización molecular de la mutación en la cepa C17.....	71
3.1. Clonamiento de la inserción MudJ de la cepa C17.....	71
3.2. Secuenciación del gen interrumpido por la inserción MudJ en la mutante C17.....	74
3.2.1. Secuenciación a partir del plasmidio pCT17.....	74
3.2.2. Secuenciación a partir del lisado de la cepa MA5419/MudP.....	80
3.3. Caracterización del gen homólogo a <i>fdhF</i> de <i>E. coli</i> en <i>S. typhi</i>	82
3.4. Regulación del probable gen <i>fdhF</i> de <i>S. typhi</i>	86
4. Caracterización del gen interrumpido en la mutante DD46.....	94
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	112
BIBLIOGRAFÍA	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas	18
Tabla 2.	Transformación de cepas de <i>S. typhimurium</i> con DNA plasmidial	40
Tabla 3.	Transformación de cepas de <i>S. typhimurium</i> con DNA cromosomal lineal.....	43
Tabla 4.	Transformación de cepas de <i>S. typhimurium</i> con DNA cromosomal de mutantes auxotróficas de <i>S. typhi::MudJ</i>	46
Tabla 5.	Localización cromosomal de inserciones MudJ en mutantes de <i>S. typhi</i>	52
Tabla 6.	Transformación de cepas de <i>S. typhi</i> con DNA cromosomal de mutantes auxotróficas de <i>S. typhi::MudJ</i>	55
Tabla 7.	Efecto del medio de crecimiento en el fenotipo invasor de <i>S. typhi</i> Ty2.....	58
Tabla 8.	Caracterización de mutantes de <i>S. typhi::MudJ</i> y sus derivadas en <i>S. typhimurium</i>	67
Tabla 9.	Caracterización de mutantes de <i>S. typhi::MudJ</i> y sus derivadas en <i>S. typhi</i>	69
Tabla 10.	Efecto de la mutación <i>oxrA</i> sobre las mutantes de <i>S. typhi</i> inducidas en anaerobiosis.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a. Transferencia de marcadores cromosomales entre <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i>	47
Figura 1b. Análisis de hibridación Southern para el marcador <i>leuA::MudJ</i>	48
Figura 2. Efecto de la osmolaridad sobre el fenotipo invasor de <i>Salmonella typhi</i> silvestre en células epiteliales HEP-2.....	61
Figura 3. Análisis por hibridación Southern de las mutantes obtenidas por transferencia del marcador MudJ desde <i>S. typhi</i> a <i>S. typhi</i> y a <i>S. typhimurium</i>	64
Figura 4. Esquema del plasmidio pCT17.....	73
Figura 5. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen <i>fdhF</i> de <i>E. coli</i> y del gen mutado por la inserción MudJ en la cepa C17.....	75
Figura 6. Alineamiento de la secuencia de la proteína FdhH de <i>E. coli</i> y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del fragmento C17-400pb.....	77
Figura 7. Alineamiento de las secuencias del gen <i>fdhF</i> y la proteína FdhH de <i>E. coli</i> con el fragmento C17-250pb.....	78
Figura 8. Secuencia nucleotídica del gen <i>fdhF</i> de <i>E. coli</i>	79
Figura 9. Derivados del fago Mu.....	81
Figura 10. Amplificación por PCR del probable gen mutado en la cepa C17.....	83
Figura 11. Amplificación por PCR del probable gen mutado en la cepa C17.....	85
Figura 12. Efecto de la mutación <i>oxrA</i> en la regulación de la expresión del probable gen <i>fdhF</i> de <i>S. typhi</i>	89
Figura 13. Regulación de la expresión del probable gen <i>fdhF</i> de <i>S. typhi</i> en distintas condiciones de crecimiento.....	91
Figura 14. Efecto de la presencia de formiato sobre la expresión del probable gen <i>fdhF</i> en <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i>	93

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	: Ampicilina
Cam	: Cloranfenicol
CTAB	: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMEM	: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEMSF	: DMEM suplementado con suero fetal de bovino al 10%
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
ExoV	: Exonucleasa V
IVET	: Tecnología de expresión <i>in vivo</i>
Kan	: Kanamicina
LD ₅₀	: Dosis letal 50
LPS	: Lipopolisacárido
ONPG	: Orto-nitro-fenil-galactopiranosido
PBS	: Tampón de fosfato salino
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SPI	: Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Tet	: Tetraciclina
TMAO	: Óxido de trimetilaminio
UFC	: Unidades formadoras de colonias
UFP	: Unidades formadoras de placa
Xgal	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

Salmonella typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea, cuyo único hospedero natural conocido es el hombre. Se caracteriza por su capacidad atravesar la barrera epitelial a nivel del intestino delgado, invadir las células epiteliales, sobrevivir y propagarse en macrófagos. La capacidad de *S. typhi* de invadir o penetrar a las células epiteliales estaría inducida por las condiciones ambientales que prevalecen durante el contacto entre ambas. Una de las condiciones que la bacteria encuentra durante este contacto es la baja disponibilidad de oxígeno, por lo cual se espera que genes cuya expresión sea regulada en anaerobiosis contribuyan, directa o indirectamente, en la capacidad de *S. typhi* de penetrar o invadir células epiteliales. Para comprobar esta hipótesis, se aislaron mutantes de *S. typhi* en genes inducidos en anaerobiosis y luego se seleccionaron aquellas que presentaron defectos en la capacidad de invadir células epiteliales HEp-2 respecto a la cepa silvestre.

El análisis genético de *S. typhi* y más aún, la caracterización de una mutación aislada en *S. typhi*, es difícil de realizar, en particular, debido a la falta de fagos transductores. Este problema fue obviado transfiriendo la mutación desde *S. typhi* a la región homóloga en el cromosoma de *S. typhimurium*, bacteria para la cual se han desarrollado eficientes herramientas genéticas que permiten mapear, secuenciar y clonar. El método consiste en electrotransformar cepas de *S. typhimurium* defectuosas en la actividad Exonucleasa V, en la enzima MutS (complejo de reparación "mismatch") y en

el sistema de restricción *hscI*, usando DNA cromosomal de las mutantes de *S. typhi*. La transferencia es mediada por eventos de recombinación homóloga que permiten reemplazar un segmento del DNA de *S. typhimurium* con la región homóloga de *S. typhi*.

Este procedimiento fue inicialmente utilizado en el análisis de varias inserciones de MudJ independientes aisladas en *S. typhi* que se transfirieron a *S. typhimurium* y fueron mapeadas respecto al cromosoma de *S. typhimurium*, usando el sistema MudP22. En principio, este método podría aplicarse a cualquier región del cromosoma de *S. typhi* si existe un marcador fácil de seleccionar en el gen de interés. Además, este procedimiento permite movilizar una mutación desde una mutante de *S. typhi* a la cepa silvestre, concretando el "backcross" en *S. typhi*.

Usando esta estrategia se analizaron algunas mutantes de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis que presentaban defectos en el fenotipo invasor a células epiteliales *in vitro*. Se transfirió la mutación a *S. typhimurium*, para identificar y caracterizar los genes involucrados en este fenotipo. Se logró mapear 4 mutantes: NN19, JJ3, DD46 y C17, 3 de las cuales presentaban además un fenotipo resistente a clorato, relacionado a defectos en el metabolismo anaeróbico del nitrato. Una de ellas, la cepa NN19, posee una inserción MudJ ubicada en la región del minuto 17 al minuto 19 del mapa de *S. typhimurium* y de acuerdo al fenotipo que presenta podría estar en el gen *modC*, que se relaciona a la captura de molibdeno, un importante cofactor de la enzima nitrato reductasa. La mutante JJ3 también presentó la inserción MudJ entre el minuto 17 y el 19, pero presentó un fenotipo distinto, lo que permite sugerir que la inserción está en el gen homólogo a *moaA*, que también está involucrado en el metabolismo del Molibdeno.

La mutación de la cepa DD46 fue localizada en la región del minuto 67 al minuto 69 de *S. typhimurium*. Fue posible secuenciar las regiones adyacentes a la inserción MudJ, luego de reemplazar este marcador por los derivados MudP y MudQ. Los resultados de esta secuenciación sugieren que la inserción MudJ está localizada en el gen homólogo a *uxaC* de *E. coli*. Este gen está involucrado en el metabolismo de los glucuronatos y galacturonatos.

La cepa C17 presentó la inserción MudJ entre el minuto 91 y 93. La secuencia obtenida a partir de un derivado MudP mostró gran similitud con el gen *fdhF* de *E. coli*, que está localizado en el minuto 92 de *E. coli* y de *S. typhimurium*, sugiriendo que éste es el gen interrumpido por MudJ en la cepa C17. Estudios de regulación del gen en *S. typhi* y *S. typhimurium* revelaron diferencias que podrían reflejar una expresión distinta durante la adaptación al metabolismo anaeróbico, y que podría tener efectos en la capacidad de invadir células epiteliales.

ABSTRACT

Salmonella typhi is the only *Salmonella* serovar that grows exclusively in humans and causes typhoid enteric fever. It is characterized by its ability to cross the mucosa of the distal ileum, as well as to survive and propagate inside human macrophage. The capacity of *Salmonella* to invade or enter into the epithelial cells is probably controlled by environmental conditions that prevail in the small intestine. Considering that one of the characteristic conditions in the small intestine is the low availability of oxygen, we propose that genes whose expression is regulated by the anaerobiosis contribute, direct or indirectly, to the capacity of *S. typhi* to penetrate or invade epithelial cells. To test this hypothesis, we selected mutants that presented defects in the capacity to invade HEp-2 epithelial cells among those strains anaerobically induced.

The genetic analysis of *S. typhi* and characterization of *S. typhi* mutants are difficult to carry out, in particular, due to the lack of generalized transducing phages. This problem was partially circumvented by transferring the region of interest into the homologous chromosomal region of closely related *Salmonella typhimurium*, where a variety of convenient mapping tools are available. Transfer involves electrotransforming *S. typhimurium* cells defective in Exonuclease V activity, the mismatch repair enzyme MutS, and the restriction system *hsd* with mildly sheared *S. typhi* chromosomal DNA. Recombination events, replacing a given segment of the *S. typhimurium* chromosome

with the homologous region *from S. typhi* can then be isolated by the appropriate selection.

We have applied this procedure to the analysis of several independent MudJ insertions, initially isolated in *S. typhi*, that were moved to *S. typhimurium* and mapped using the "locked-in" MudP22 system. This method could be applied to any region of the *S. typhi* chromosome where a selectable marker in a gene of interest is available. Furthermore, this procedure also allows mobilization of a mutation from one genetic background into another *S. typhi* strains.

Using this method, we characterized four strains induced in anaerobiosis and impaired in the invasion of epithelial cells *in vitro*. The MudJ insertions of four mutants, NN19, JJ3, DD46 and C17, were transferred to *S. typhimurium* and mapped. Three of these mutants were also chlorate resistant. This phenotype was related to the failure of the anaerobic metabolism of nitrate. In the strain NN19, MudJ was located between minutes 17 to 19 of the *S. typhimurium* map. According to the phenotype of this strain, we can suggest that *modC* homologous gene is mutated in strain NN19. This gene is related to molybdenum uptake, an important cofactor of the nitrate reductase. The mutant JJ13 also contained the MudJ insertion between minutes 17 and 19, suggesting that the insert could be in the homologous gene to *moaA*, which is also involved in the metabolism of the molybdenum.

The MudJ insertion of the strain DD46 was located between minutes 67-69 of the *S. typhimurium*. It was possible to sequence the flanking regions of MudJ, after

replacing this marker for MudP and MudQ. The results of this sequence suggest that the mutated gene is the homolog of *E. coli uxaC* gene. This gene is involved in the glucuronates and galacturonates metabolism.

The strain C17 harbored the MudJ insertion between minutes 91-93. The sequence obtained from a MudP lysate from a C17 derivative strain showed homology with the *fdhF* gene of *E. coli*. This gene is located at minute 92 of *E. coli* and *S. typhimurium* chromosomes, suggesting that this is the gene interrupted by MudJ in the strain C17. Regulation of this gene appears to be different in *S. typhi* and *S. typhimurium*. This perhaps reflects an adaptation to anaerobic metabolism in the case of *S. typhi*.

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* comprende más de 2.200 serovares distintos, algunos de los cuales pueden infectar un amplio rango de hospedero. *S. enteritidis*, por ejemplo, es capaz de infectar un gran número de aves y mamíferos, incluyendo el hombre, causando una variedad de síntomas dependiendo del hospedero. Otros, en cambio, son altamente adaptados a un hospedero específico, como es el caso de *S. gallinarum* que infecta sólo a aves, o *S. typhi*, que es el único serovar conocido que infecta exclusivamente al hombre, produciendo la fiebre tifoidea (Collins, 1974).

Aún cuando la incidencia de la fiebre tifoidea tiende a disminuir, se ha estimado que anualmente se presentan 16,6 millones de casos de fiebre tifoidea, y aproximadamente 600.000 muertes en el mundo (Pang y col., 1995). Conociendo la real dimensión del problema de salud pública que representa esta enfermedad, en general, en los países en vías de desarrollo, se hace imprescindible implementar nuevas estrategias de prevención y control. Estas estrategias deben estar dirigidas a mejorar las condiciones sanitarias y tratamientos de agua y por otra parte a desarrollar vacunas con mayor eficacia que las diseñadas hasta ahora (Dougan y col., 1987; Pang y col., 1995). Por esta razón, es necesario estudiar las bases moleculares de los mecanismos de patogenicidad de *S. typhi*, cuya comprensión permitirá abordar el problema desde nuevas perspectivas.

S. typhi inicia su ciclo infectivo en el hombre al ser ingerida en alimentos y aguas contaminadas. Luego de sobrevivir a los mecanismos de defensa presentes en el tracto digestivo, la bacteria atraviesa la barrera intestinal a nivel del íleo, para llegar al tejido linfoide subyacente. Desde allí las bacterias son fagocitadas y transportadas dentro de los macrófagos hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, donde se multiplican y se diseminan al torrente sanguíneo, desencadenando así la fiebre tifoidea. Una última fase del ciclo se llevaría cabo sólo en algunos individuos y consiste en el asentamiento de la bacteria en órganos como la vesícula biliar, lo cual conduce al estado de portador crónico (Takeuchi, 1967; Finlay y Falkow, 1989)

Aún cuando el ciclo infectivo de *Salmonella* parece bien caracterizado a nivel fisiológico (Takeuchi, 1967; Francis y col., 1992), no se conocen en detalle los mecanismos moleculares de este proceso. Entre las etapas claves del ciclo infectivo de *S. typhi* y de otras *Salmonellas*, destacan la invasión de células epiteliales y la sobrevivencia dentro de macrófagos, que le permite a la bacteria diseminarse en el sistema retículoendotelial y permanecer en él.

La mayor parte de la información en relación a los mecanismos de invasión a células epiteliales y sobrevivencia en macrófagos murinos, ha sido derivada de ensayos en cultivos celulares. En el modelo de *S. typhimurium*-ratón se ha podido demostrar una relación directa entre la virulencia de la bacteria *in vivo*, con la capacidad de invadir células epiteliales y sobrevivir en macrófagos *in vitro*, validando de esta forma la importancia de estos eventos en la patogenicidad de la bacteria (Galán y Curtiss, 1989; Bäumlér y col., 1994; Penheiter y col., 1997). El estudio de mutantes defectuosas en

estos procesos, ha permitido descifrar poco a poco los mecanismos por los cuales la bacteria logra acceder al interior del hospedero y sobrevivir en él.

S. typhimurium atraviesa la barrera epitelial del intestino de ratón, desde la superficie apical hacia el tejido subyacente, induciendo importantes cambios morfológicos en el epitelio. Entre ellos se destaca la desaparición de las microvellosidades en los puntos de contacto entre la bacteria y la célula eucariótica (Clark y col., 1994; Jones y col., 1994; Penheitter y col., 1997). Cambios similares se han registrado *in vitro*. El contacto de la bacteria con la célula eucariótica es capaz de inducir reordenamientos del citoesqueleto de la célula debido a polimerización de microfilamentos de actina, que conducen a movimientos ondulatorios denominados "ruffling" y permiten finalmente englobar a la bacteria en vacuolas (Francis y col., 1992; 1993). Estos eventos son acompañados además por aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y una captación masiva de fluido extracelular o macropinocitosis. (Pace y col., 1993; García del Portillo y Finlay, 1994). Cada una de estas etapas es esencial para que la bacteria sea internalizada; de hecho, mutantes de *S. typhimurium* defectuosas en invasión fueron incapaces de inducir estos cambios en células epiteliales (Ginocchio y col., 1992; Ginocchio y col., 1994; García del Portillo y Finlay, 1994). La célula epitelial cumple un rol activo en este proceso, ya que la interacción de la bacteria con la célula a 4°C no culmina con la invasión de la bacteria, solo es posible detectar adherencia a la célula. Además, al inhibir la polimerización de actina, usando citocalasinas, es posible bloquear la internalización de la bacteria (Finlay y Falkow, 1988).

Estudios del fenotipo invasor de *S. typhi* a células epiteliales han mostrado que, en líneas generales, este proceso es similar al caracterizado en *S. typhimurium* y otras enterobacterias. Se destaca la capacidad de inducir "ruffling" en la célula epitelial, la inhibición de la entrada de la bacteria a la célula por acción de citocalasinas, la cinética de entrada, aún cuando la eficiencia de la invasión es menor para *S. typhi* (Yabuuchi y col., 1986; Mroczenski-Wildey y col., 1989; Mills y Finlay, 1994; Leclerc y col., 1998).

S. typhi también es capaz de invadir células M *in vitro* (Kohbata y col., 1986). Las células M son células epiteliales especializadas (membranosas), que participan en la transferencia de antígenos desde el lumen intestinal a los folículos linfoides a los cuales están asociadas. Representan alrededor del 10% del total de células presentes en las placas de Peyer (Owen y Jones, 1974). En el modelo de segmentos de íleo de ratón ligado, se ha visto que *S. typhi* y *S. typhimurium* son capaces de asociarse preferencialmente a las células M, pero sólo *S. typhimurium* sería capaz de destruir estas células y producir un daño importante en el epitelio; *S. typhi* produciría un daño menor en las células M sin alterar los enterocitos de la capa epitelial (Kohbata y col., 1986; Clark y col., 1994; Jones y col., 1994; Pascopella y col., 1995; Penheitter y col., 1997).

No obstante la similitud de proceso global, persisten diferencias entre *S. typhi* y *S. typhimurium* en los mecanismos de infección. Se ha demostrado *in vitro* que la presencia del lipopolisacárido (LPS) intacto es necesaria para que *S. typhi* pueda ser internalizada por células HeLa (Mroczenski-Wildey y col., 1989). Sin embargo, se ha probado que mutantes rugosas (con LPS defectivo) son tan virulentas como la cepa silvestre y son capaces de producir la enfermedad en humanos (Hone y col., 1988). En

cambio, en *S. typhimurium* se ha observado que mutantes rugosas por defectos en el gen *galE*, que codifica para una enzima involucrada en la síntesis del LPS, son atenuadas cuando son inoculadas en ratón o en ternero (Clarke y Gyles, 1986; Hone y col., 1987).

Usando mutantes por inserción de Tn5 se ha demostrado que la motilidad de la bacteria afecta el fenotipo invasor en *S. typhi*, pero no en *S. typhimurium* (Liu y col., 1988). Por otro lado, *S. typhimurium* requiere la presencia de un plasmidio para expresar su potencial virulento, elemento que no está presente en *S. typhi* (Roudier y col., 1990). El perfil de regulación de algunos factores de virulencia dependientes de PhoP/PhoQ aparece diferente entre ambas *Salmonellas*, (Baker y col., 1997), lo cual sugiere respuestas adaptativas distintas frente a los mismos estímulos. Uno de los hallazgos más recientes indican que *S. typhi* carece de uno de los genes codificados dentro de la isla de patogenicidad de *Salmonella*, SPI 1, denominado *avrA* por la homología que presenta con genes de avirulencia de fitopatógenos (Hardt y Galán, 1997). Este interesante resultado sugiere la posibilidad que existan mecanismos comunes entre enterobacterias y fitopatógenos en relación a la especificidad de hospedero, mecanismo que aún se desconoce para *S. typhi*.

Genética del proceso de invasión en *Salmonella*

La tendencia general de los primeros estudios de la genética de los procesos de invasión y proliferación intracelular de patógenos entéricos y especialmente de *Salmonella*, se basaron en el clonamiento de genes capaces de conferir la capacidad

invasora a una cepa de *E. coli* no invasora. Esta estrategia fue muy efectiva para *Yersinia pseudotuberculosis*, ya que se clonó el locus *inv*, cuyo producto génico fue, por sí sólo, capaz de conferir el fenotipo invasor a una cepa de *E. coli* no invasora (Isberg y Falkow, 1985). En *Yersinia enterocolitica* se descubrió un segundo locus denominado *ail*, que codifica para una proteína de la membrana externa. Esta proteína, en conjunto con la proteína Inv, serían responsables de conferir el fenotipo invasor a *Yersinia enterocolitica* (Miller y Falkow, 1988).

Para *S. typhi* en cambio, esta estrategia no resultó exitosa, ya que sólo se logró transferir parcialmente el fenotipo invasor a *E. coli*. Elsinghort y colaboradores aislaron clones de *E. coli* que invadieron células epiteliales entre un 4 a un 7% respecto a lo observado para *S. typhi* (Elsinghort y col., 1989). Esto sugiere que la expresión de este fenotipo en *Salmonella* es multifactorial. En este trabajo, se caracterizaron los plasmidios que conferían el fenotipo invasor y se logró identificar un locus denominado *inv*. Éste también estaba presente en *S. typhimurium*, pero al ser transferido a *E. coli* no logró modificar el fenotipo no invasor de la cepa.

Los primeros estudios genéticos del proceso de invasión en *S. typhimurium* consistieron en clonar genes provenientes de una cepa virulenta que complementarían a una cepa no virulenta para el ratón; de esta forma se logró ubicar un locus distinto al descrito para *S. typhi*, que también se llamó *inv* (Galán y Curtiss, 1989).

Otra estrategia ampliamente utilizada para comprender la genética del fenotipo invasor, ha sido la caracterización de mutantes que carezcan de esta propiedad,

obtenidas por inserción de transposones como *Tn10*, *TnphoA*, y derivados de Mu, que inactivan el gen en el cual se insertan. Galán y colaboradores utilizaron esta estrategia para caracterizar el locus *inv* de *S. typhimurium*. Ellos demostraron que este locus, compuesto de al menos 13 genes, está presente en la mayoría de los serotipos de *Salmonella*, incluyendo *S. typhi* (Galán y Curtiss III, 1991; Galán, 1996). Más aún, obtuvieron mutantes en distintos genes *inv* que presentaron defectos en la capacidad de invadir células epiteliales en cultivo, indicando que estos genes están involucrados funcionalmente en el fenotipo invasor. Demostraron además que mutantes *inv* de *S. typhimurium* son menos virulentas que la cepa silvestre en ratones cuando son inoculadas oralmente, aumentando la dosis letal cincuenta (LD_{50}) en 2 a 3 órdenes de magnitud (Galán y Curtiss, 1991). Cabe destacar, sin embargo, que estas mutantes son igualmente virulentas que la cepa silvestre cuando son administradas por vía intraperitoneal (Galán y col., 1992). En *S. typhimurium* ya se han caracterizado seis loci distintos implicados en el fenotipo invasor (Betts y Finlay, 1992). Un estudio similar indicó que en *S. enteritidis* existen al menos nueve loci distintos, de los cuales uno corresponde al locus *inv* descrito para *S. typhimurium* (Stone y col., 1992). Estos resultados sugieren la gran complejidad del proceso de invasión o entrada a las células eucarióticas en *Salmonella*.

También se han obtenido mutantes de *S. typhi* defectivas en invasión (Hermant y col., 1995; Leclerc y col., 1998). La mayoría de las mutantes aisladas en estos trabajos coincidieron en el aislamiento de genes homólogos a algunos descritos en *S. typhimurium* (Behlau y Miller, 1993; Kaniga y col., 1994, 1995).

En los últimos diez años se ha logrado descifrar un gran número de genes involucrados en el proceso de entrada de *S. typhimurium* a células epiteliales. La mayoría de los genes identificados están agrupados en zonas específicas del cromosoma, de gran tamaño, denominadas "islas de patogenicidad", que probablemente han sido adquiridas por transferencia horizontal, ya que presentan un contenido de G+C distinto del promedio de la bacteria (Hacker y col., 1997). En *S. typhimurium* se han definido cuatro islas de patogenicidad, SPI, que están presentes en aislados clínicos virulentos y ausentes en las cepas no virulentas, participando directa o indirectamente en los eventos de entrada de la bacteria a las células epiteliales y la sobrevivencia en el interior de los macrófagos (Galán, 1996; Shea y col., 1996; Blanc-Potard y Groisman, 1997; Wong y col., 1998). Tres de estas SPI han sido detectadas en *S. typhi* (Ochman y Groisman, 1996; Wong y col., 1998).

La mayoría de los genes involucrados en el proceso de invasión a células epiteliales, descritos hasta ahora, están agrupados en la SPI 1. Ésta es específica para *Salmonella* y se ubica en el minuto 63 del cromosoma de *S. typhimurium* (Galán, 1996). Gran parte de los genes presentes en la SPI 1, entre ellos el locus *inv/spa*, codifican para genes estructurales y regulatorios de un nuevo sistema de secreción, denominado tipo III (Galán, 1996). Este aparato de secreción permitiría exportar algunas proteínas, codificadas también en este locus, a la superficie bacteriana de *S. typhimurium*. Se ha visto que este sistema de secreción permitiría además translocar algunas proteínas directamente al citoplasma de la célula epitelial (Collazo y col., 1995; Wood y col., 1996; Collazo y Galán, 1997). No se ha establecido aún si las proteínas caracterizadas en estos trabajos son los verdaderos efectores que inducirían la internalización de la

bacteria. El sistema de secreción sería específico para la secreción de factores de virulencia. Un análisis de la secuencia de los genes que codifican para este aparato de secreción indican que existen sistemas semejantes en otros enteropatógenos como *Shigella* y *Yersinia* y también en fitopatógenos como *Pseudomonas solanacearum* y *Xanthomonas campestris* y presentan además alta homología con los genes involucrados en el ensamblaje del flagelo de *E. coli* (Van Gijsegem y col., 1993).

La segunda SPI caracterizada en *S. typhimurium*, SPI 2, fue descubierta mediante selección negativa de aquellas mutantes incapaces de sobrevivir en el ratón y se ubica en el minuto 31 del mapa de *S. typhimurium* (Hensel y col., 1995). El análisis de la secuencia de los genes involucrados en este loci, indicó que también codificaría para un aparato secretor tipo III, cuya expresión sería importante en la sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos y por lo tanto en la virulencia del enteropatógeno (Shea y col., 1996).

Las estrategias genéticas más recientes utilizadas para la identificación de genes implicados en la virulencia bacteriana, se basan en la obtención de mutantes que disminuyen o pierden su capacidad virulenta, usando al animal como medio de selección. Una de ellas se denomina IVET (tecnología de expresión *in vivo*), que permite el aislamiento de genes bacterianos específicamente inducidos durante la infección. Para ello, se utilizan genes reporteros sin promotor propio, que codifican para una vía sintética que complementa un defecto metabólico de la bacteria receptora. Éste se expresa sólo cuando la construcción génica queda bajo el promotor de un gen que se induce durante el ciclo infectivo de la bacteria. De esta forma, al infectar un ratón con un

grupo de mutantes, se recuperan desde los órganos internos sólo aquellas mutantes capaces de sobrevivir en el ratón (Heithoff y col., 1997). Otro sistema que ha aportado importante información respecto a los genes de virulencia en *S. typhimurium* es el método de selección negativa por el cual se identificó la SPI 2, que consiste en marcar individualmente cada mutante con un transposón que lleva un segmento de DNA generado al azar y que es diferente para cada clon. Esta marcación permite reconocer los clones ausentes en el grupo de mutantes recuperadas desde el ratón infectado, lo que implica que corresponden a clones incapaces de sobrevivir en el ratón (Hensel y col., 1995).

Utilizando estas técnicas, se ha demostrado que no sólo los genes tradicionalmente involucrados en el fenotipo invasor, como los ya mencionados, o aquéllos que codifican para toxinas son importantes en la virulencia bacteriana, sino también algunos genes implicados en el metabolismo general o también llamados "housekeeping genes".

Algunos de los genes identificados usando estas estrategias génicas codifican para funciones regulatorias, los que permitirían responder coordinando la expresión de los factores de virulencia necesarios en un determinado momento (*phoP/phoQ*; *envZ/ompR*). Un importante número de genes inducidos durante la infección corresponden a genes metabólicos, que probablemente pueden contribuir a la supervivencia del patógeno y su persistencia en condiciones limitadas de nutrientes. Es factible también que no sean esenciales para la virulencia de la bacteria debido a sus funciones bioquímicas, sino que podrían cumplir otros roles en el proceso de infección (Hensel y col., 1995; Heithoff y col., 1997).

Estos resultados han puesto en discusión la definición de factores de virulencia, que en un sentido más amplio acepta que cualquier propiedad que le permita al patógeno entrar, crecer o sobrevivir en el hospedero podría ser considerado como factor de virulencia. Esto incluye por ejemplo: antígenos de superficie que eviten los efectos del complemento; estructuras de la bacteria que permitan adherirse a las células blanco; sistemas reguladores que le permitan adaptarse a las condiciones ambientales que el hospedero ofrece, e incluso actividades enzimáticas que le permitan sintetizar nutrientes que no están disponibles en el hospedero (Slauch y col., 1997).

Regulación del fenotipo invasor

La interacción bacteria-hospedero en el ciclo infectivo de un parásito intracelular facultativo es un proceso dinámico, durante el cual el patógeno está expuesto a diversos ambientes intra- y extracelulares. Estos cambios son percibidos por la bacteria, provocando una respuesta que le permite adaptarse a las nuevas condiciones y sobrevivir en ellas (Mekalanos, 1992).

La expresión de muchos, si no todos, los genes requeridos para la invasión a células epiteliales está finamente regulada en respuesta a las condiciones ambientales presentes en el intestino, donde prima la baja disponibilidad de oxígeno, la carencia de hierro y la alta osmolaridad entre otros (Mekalanos, 1992).

Se ha demostrado por ejemplo, que *S. typhimurium* crecida en condiciones anaeróbicas aumenta su capacidad invasora en células en cultivo respecto a la bacteria crecida aeróbicamente (Schiemann y Shope, 1991). Además, se han aislado genes inducidos en anaerobiosis, por ejemplo el gen *orgA* codificado en la SPI 1, que al ser mutados hacen a la bacteria menos virulenta que la cepa silvestre (atenuada). La proteína deducida para el gen *orgA* no presenta similitud con proteínas conocidas y se desconoce hasta la fecha su función y su relación con el fenotipo invasor (Jones y Falkow, 1994).

Los enteropatógenos están presentes en aguas contaminadas, donde el ambiente generalmente presenta temperatura y osmolaridad menor que aquéllas que la bacteria encuentra en el hospedero. Se ha demostrado que cambios en estos parámetros influyen sobre la capacidad de la bacteria de invadir células en cultivo. *Shigella flexneri* por ejemplo, es virulenta *in vivo* a 37°C pero no a 30°C, hecho que correlaciona con la capacidad de invadir cultivos celulares a 37°C, y no a 30°C (Maurelli y col., 1984; Maurelli y Sansonetti, 1988).

Consecuentemente, no sólo el fenotipo invasor es afectado por las condiciones ambientales, sino también la expresión de genes involucrados en este fenotipo es modificada por las condiciones del medio ambiente. Usando como gen reportero *lacZ* fusionado a genes involucrados en el fenotipo invasor, se demostró que la variación de pH, disponibilidad de oxígeno y osmolaridad modifican la expresión de estos genes (Bajaj y col., 1996). Además, se demostró que estas variaciones son dependientes del regulador transcripcional HilA (Bajaj y col., 1995). Este regulador coordinaría la expresión de los genes pertenecientes a la SPI 1 de acuerdo a las condiciones del medio

ambiente, para favorecer la expresión del fenotipo invasor cuando la bacteria reconoce las condiciones ambientales que encuentra en el interior del hospedero (Bajaj y col., 1996).

Los mecanismos por los cuales la bacteria responde a los cambios del medio ambiente, en general se basan en los sistemas de regulación de dos componentes. Están constituidos por una proteína sensora, generalmente inserta en la membrana citoplásmica que transmite la señal al segundo componente que es el regulador, proteína soluble que puede unirse al DNA y modificar su expresión. El gen *hilA*, que forma parte de la SPI, codifica para el regulador HilA y presenta similitud de secuencia con reguladores del tipo OmpR/ToxR, pertenecientes al sistema clásico de regulación de dos componentes (Bajaj y col., 1995). Otro ejemplo de genes reguladores de la expresión de determinantes de virulencia, lo constituye el sistema *phoP/phoQ* descrito en *S. typhimurium*. Este sistema regula la expresión de los genes *pag* (activados por PhoP) y los genes *prg* (reprimidos por PhoP), involucrados en la capacidad de sobrevivir dentro del macrófago (Miller y col., 1991) y también coordinaría la regulación del fenotipo invasor en células epiteliales a través de los genes *prgH* y *hilA* (Behlau y Miller, 1993; Bajaj y col., 1996).

La variación de la topología del DNA representa una forma de control global que tiene el potencial de influir en la expresión de algunos genes bacterianos, constituyéndose en uno de los mecanismos de regulación de la expresión de factores de virulencia (Dorman y Ni Bhrhain, 1993). Esto se llevaría a cabo a través de las enzimas del tipo topoisomerasas y a través de proteínas que forman parte de la arquitectura del DNA. Se ha relacionado la regulación de los factores de virulencia de *Shigella*, tanto por

osmolaridad como por temperatura, a la expresión de la proteína H-NS, que reprimiría la expresión génica a baja temperatura y baja osmolaridad. Esta proteína es una proteína tipo histona involucrada en los cambios de topología del DNA y que originalmente se describió como el regulador VirR (Porter y Dorman, 1994). En *S. typhi* y *S. typhimurium* también se ha descrito que el fenotipo invasor es regulado por cambios en la osmolaridad del medio debido a cambios en la topología del DNA (Galán y Curtiss III, 1990; Tartera y Metcalf, 1993).

Nuestro laboratorio está interesado en los mecanismos moleculares de la patogenicidad de *S. typhi*, particularmente en los eventos tempranos de la infección, que incluyen la interacción de la bacteria con las células epiteliales en el lumen intestinal, y la capacidad de *S. typhi* de sobrevivir en macrófagos humanos. El estudio de estos procesos permitiría comprender el ciclo infeccioso de *S. typhi*, establecer algunas comparaciones con los procesos descritos para otros enteropatógenos y eventualmente, permitiría diseñar nuevas estrategias para combatir la fiebre tifoidea.

Este trabajo de tesis propone estudiar el fenotipo invasor de *S. typhi* en células epiteliales en cultivo, como un acercamiento al proceso de entrada de la bacteria a su hospedero natural, el hombre. Es posible que en esta etapa temprana de la infección algunos eventos den cuenta de la especificidad de hospedero y, por lo tanto, factores involucrados en esta etapa puedan descifrar por qué el hombre es el único hospedero natural que se conoce para *S. typhi*.

Considerando que la baja disponibilidad de oxígeno es una de las condiciones que caracteriza el ambiente durante el contacto entre la bacteria y las células epiteliales en el lumen intestinal, hemos planteado como hipótesis de trabajo que genes cuya expresión es regulada en anaerobiosis participan, directa o indirectamente, en el fenotipo invasor de *S. typhi*.

Para estudiar este proceso se generó una colección de mutantes de *S. typhi* por inserción del fago MudJ. Este fago defectivo carece de transposasas, lo cual permite obtener inserciones estables en el cromosoma bacteriano; además posee el marcador de resistencia a kanamicina, y el gen reportero *lacZ* que codifica para β -galactosidasa que genera fusiones de operón con el gen mutado. La expresión de la enzima queda bajo el comando del promotor del gen donde se insertó el transposón, permitiendo estudiar la regulación de la expresión del gen mutado (Casadaban y Cohen, 1979). A partir de una serie de mutantes de *S. typhi*, se seleccionaron aquellas mutaciones reguladas por la disponibilidad de oxígeno. Entre estas mutantes, se estudió su capacidad de invadir células epiteliales humanas *in vitro* y se caracterizó fenotípicamente aquellas que presentaban defectos en la invasión a la línea celular HEp-2.

En el marco de este trabajo de tesis e interesados en identificar los genes involucrados en este proceso como objetivo general, se escogieron algunas de estas mutantes de *S. typhi* y se caracterizaron genéticamente.

El estudio genético en *S. typhi* se ha visto limitado por la falta un modelo animal que permita ensayar directamente esta bacteria, además de la falta de herramientas

genéticas adecuadas, como los fagos transductores. Uno de los puntos importantes en el estudio genético se basa en la transferencia de la mutación a un contexto genético silvestre ("backcross"), para así verificar que el fenotipo observado está directamente relacionado a la mutación estudiada. Esta estrategia es fácilmente realizable cuando se cuenta con fagos transductores que permiten hacer la transferencia en una sola etapa, pero para el caso de *S. typhi* no se dispone de esta valiosa herramienta genética. Por ello se planteó como uno de los objetivos de este trabajo de tesis, desarrollar un método sencillo y de fácil aplicación, que permitiera hacer la transferencia de un marcador cromosomal desde una *S. typhi* a otra *S. typhi* o a una *S. typhimurium*.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- Desarrollar un método que permita transferir marcadores cromosomales desde mutantes de *S. typhi* a *S. typhi* silvestre o a *S. typhimurium* silvestre.
- Determinar las condiciones ambientales que favorezcan la invasión de células epiteliales HEP-2 por *S. typhi* silvestre *in vitro*.
- Seleccionar, a partir de la colección de mutantes por inserción MudJ, mutantes de *S. typhi* reguladas en anaerobiosis, que presenten una capacidad alterada para invadir la línea celular HEP-2, comparado con la cepa nativa.
- Caracterizar genéticamente las mutantes de invasión escogidas, mediante mapeo de la mutación, utilizando el sistema MudP22.
- Clonar y secuenciar alguno de los genes mutados, para identificar el producto génico involucrado en este fenotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio están ordenadas en la Tabla 1. Algunas de ellas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Lionello Bossi, del laboratorio de Genética Molecular, CNRS (Gif sur Yvette, Francia) y por el Dr. Stanley Maloy, Universidad de Illinois, USA. Cuando no se indica, las cepas son derivadas de *S. typhi* Ty2 silvestre o *S. typhimurium* LT2 silvestre. Las mutantes de *S. typhi* auxótroficas fueron construidas por inserción del transposón MudJ mediante cis-complementación transitoria usando P22 (Maloy, 1990). Las mutantes NN19, JJ3, DD46 y C17 fueron obtenidas por transposición de MudJ por cis-complementación usando derivados del fago Mu (Contreras y col., 1994). Las cepas TyT2123, TyT2124 y TyT2132 fueron obtenidas por transducción desde las mutantes de *S. typhimurium* MA463, DEH53 y MA1449 respectivamente. Las cepas TyT2161 a la TyT2165 fueron construidas como se detalla en este estudio. La colección de 50 cepas que contienen los profagos MudP22 no está incluida en la lista. Esta colección fue descrita por Benson y Goldman (1992), y fue gentilmente donada por K. Sanderson.

TABLA 1. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo o Fenotipo relevante	Origen
<i>Salmonella typhi</i>		
Ty2	cepa silvestre, auxotrófica para cisteína y triptofano	O.M.S.
TyT 1009	<i>met::MudJ</i>	G. Mora
TyT 1015	<i>arg::MudJ</i>	G. Mora
TyT 1020	<i>ile::MudJ</i>	G. Mora
TyT 1031	<i>leu::MudJ</i>	G. Mora
TyT 1041	<i>phe::MudJ</i>	G. Mora
TyT 2123	<i>hisC9968::MudJ</i> ,	Este estudio
TyT 2124	<i>proU2881::MudJ</i>	Este estudio
TyT2132	<i>mutS::Tn10dCam Δatt1449leuA::MudJ</i>	Este estudio
NN19	resistente a clorato; defectuosa en invasión a HEP-2	G. Mora
DD46	resistente a clorato; defectuosa en invasión a HEP-2	G. Mora
JJ3	resistente a clorato; defectuosa en invasión a HEP-2	G. Mora
C17	Inducida en anaerobiosis; defectuosa en invasión	G. Mora
TyT 2161	Inserción MudJ derivada de C17 en la cepa Ty2	Este estudio
TyT 2163	Inserción MudJ derivada de NN19 en la cepa Ty2	Este estudio
TyT 2164	Inserción MudJ derivada de JJ3 en la cepa Ty2	Este estudio
TyT 2165	Inserción MudJ derivada de DD46 en la cepa Ty2	Este estudio
<i>Salmonella typhimurium</i>		
LT2	cepa silvestre	
14028s	cepa virulenta	
DEH53	<i>zde(38)::Tn10dTet proU2881::MudJ</i>	L. Bossi
MA463	<i>hisC9968::MudJ</i>	L. Bossi
MA1449	<i>leu500 Δatt 1449 leuA::MudJ</i>	L. Bossi
MA2253	<i>recD543::Tn10dTet</i>	L. Bossi
MA5094	<i>mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5098	<i>recD543::Tn10dTet mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA4426	<i>sbcE21 zfe8157::Tn10dTet Δ1742 (arg-recBD)</i>	L. Bossi
MA5100	MA4426 <i>mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5114	<i>leuA::MudJ mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5133	<i>leuA::MudJ recD543::Tn10dTet</i>	Este estudio

Continuación Tabla 1

Cepa	Genotipo o Fenotipo relevante	Origen
<i>Salmonella typhimurium</i>		
MA5116	<i>leuA::MudJ recD543::Tn10dTet mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5031	<i>leuA::MudJ sbcE21 zfe8157::Tn10dTet Δ1742 (arg-recBD)</i>	Este estudio
MA5145	<i>leuA::MudJ sbcE21 zfe8157::Tn10dTet Δ1742 (arg-recBD) mutS:: Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5368A	MA5098 <i>leuA::MudJ</i> obtenida por transformación	Este estudio
MA5368B	MA5100 <i>leuA::MudJ</i> obtenida por transformación	Este estudio
TT16716	<i>his-644 pro-621/F'128 pro+lacZ477::Tn10d(Tc)</i>	K. Sanderson
SL4213	<i>metA22 metE551 galE496 rpsL120 xyl104 (fls2) Hi-6 H2 enx nml hsdIS hsdA29</i>	B. Stocker
MA5379	SL4213 <i>mutS::Tn10dCam</i>	Este estudio
MA5380	SL4213 <i>recD543::Tn10dTet</i>	Este estudio
MA5383	SL4213 <i>recD543::Tn10dTet mutS::Tn10 dCam</i>	Este estudio
MA5419	inserción <i>MudJ</i> derivada de la cepa C17 en la cepa LT2	Este estudio
MA5419/MudP	inserción <i>MudP</i> reemplazando <i>MudJ</i> en la cepa MA5419	Este estudio
MA5432	inserción <i>MudJ</i> derivada de NN19 en la cepa 14028	Este estudio
MA5435	inserción <i>MudJ</i> derivada de JJ3 en la cepa 14028	Este estudio
MA5438	inserción <i>MudJ</i> derivada de DD46 en la cepa 14028	Este estudio
MA5442	inserción <i>MudJ</i> derivada de C17 en la cepa 14028	Este estudio
MST2970	<i>oxrA2::Tn10</i>	V. Stewart
MST3529	<i>thr469::MudP / pJS28 (gene9⁺, Amp^r)</i>	S. Maloy
MST3530	<i>thr469::MudQ / pJS28 (gene9⁺, Amp^r)</i>	S. Maloy
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 ΔlacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
EM487	F ⁻ <i>lacU169 araD139 thi non nalA rpsL metE Δ(recA-srI) / pJP317</i>	S. Maloy

1.2. Plasmidios

pCV47: contiene un fragmento de 18 kb de DNA cromosomal de *S. typhimurium*, que incluye el operón *leu* completo (Squires y col., 1983)

pJP317: contiene el fragmento HindIII de MudJ clonado en pUC19, cedido gentilmente por el Dr. S. Maloy.

pCT17: fragmento de 4kb de DNA cromosomal de la mutante de *S. typhi* C17, obtenido por digestión con Sal I y clonado en el plasmidio pBlueScript II KS (+). Contiene el gen de resistencia a Kanamicina de MudJ y el extremo 3'OH del gen mutado (este trabajo).

1.3. Bacteriófagos

P22 HT105/1 *int*-201: Fago transductor generalizado para *Salmonella*, P22 HT*int*, derivado de P22 que corresponde a un mutante de alta frecuencia de transducción (Schmieger, 1972).

P22 H5: Fago lítico para *S. typhimurium* derivado de P22, mutante en el represor *c2*. Ambos fagos fueron gentilmente donados por el Dr. S. Maloy.

MudP22: fago híbrido que contiene los extremos derecho e izquierdo de Mu reconocidos por las transposasas, que flanquean el material genético del fago P22 defectuoso en el proceso de integración y escisión (Youderian y col., 1988).

2. Medios de cultivo bacteriano

Las bacterias se crecieron rutinariamente en caldo Luria (LB) como medio enriquecido (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5g/l) o medio E como medio mínimo ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02g/l, ácido cítrico monohidratado 2g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 13,1g/l) suplementado con glucosa 2g/l como única fuente de carbono y aminoácidos cuando fue necesario. Los medios sólidos fueron preparados agregando 15g/l de agar agar.

Los antibióticos usados fueron: kanamicina (Kan) 50 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina (Tet) 10 $\mu\text{g/ml}$, y ampicilina (Amp) 50 $\mu\text{g/ml}$. El sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (Xgal) fue agregado a las placas a una concentración final de 30 $\mu\text{g/ml}$. Se suplementó el medio de cultivo con KNO_3 50mM, TMAO 40mM o formiato de sodio 30mM cuando fue necesario. Para la selección de cepas sensibles a Tet se usó el medio Bochner-Maloy (Maloy y Nunn, 1981), que consiste en triptona 5g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l, agar agar 15g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10g/l, clortetraciclina 0,5g/l; ZnCl_2 0,1mM y ácido fusárico 15mg/l. El medio SOC (triptona 20g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl_2 10mM, MgSO_4 10mM, glucosa 20mM), fue usado para el crecimiento bacteriano después de una electroporación (Hanahan, 1985).

Para medir resistencia a clorato se hicieron diluciones en serie de un cultivo fresco, y se sembró 0,1 ml de cada dilución sobre placas de medio mínimo E suplementado con glucosa 2g/l, cisteína 50 mg/l, triptofano 50 mg/l y nitrato de potasio

20mM. Se agregó a la placa clorato de potasio a una concentración final de 15mM (Contreras, 1994).

3. Condiciones de cultivo bacteriano

Los cultivos aeróbicos fueron obtenidos inoculando 50 μ l de un cultivo bacteriano saturado, crecido toda la noche, sobre 5ml de LB en un matraz de 100ml y crecidos a 37°C con agitación vigorosa hasta fase exponencial temprana (densidad óptica entre 0,2 y 0,3 unidades de absorbancia a 600 nm). Los cultivos anaeróbicos fueron realizados en tubos Spectronic, cubiertos con una capa de aceite mineral estéril e incubados hasta fase exponencial temprana a 37°C sin agitación. La variación de osmolaridad del medio de cultivo bacteriano se obtuvo modificando la concentración de NaCl de 0 a 20g/l en LB.

4. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular epitelial HEp-2 (ATCC CCL23), derivada de un carcinoma humano de laringe, donada por el Dr. José Manuel Ojeda. Las células fueron cultivadas en botellas de 50ml con 5ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (DMEMSF), a 37°C en una atmósfera de CO₂ 10% y aire 90%. El medio de cultivo de cada botella fue cambiado por medio fresco cada 2 a 3 días.

La noche previa a cada ensayo de invasión y proliferación intracelular, las células fueron removidas de la botella por adición de 2 ml de tripsina 0,5g/l y EDTA 0,2g/l disueltos en PBS. Se incubó la botella a 37°C por 2 min y luego se agitó suavemente para desprender las células. Luego, se agregó 5 ml de DMEMSF para inactivar la tripsina y se centrifugó a 1200rpm por 5min en centrífuga clínica; se resuspendió el sedimento en medio fresco, para contar las células usando una cámara de Neubauer. Finalmente, se sembraron 5×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, para obtener una monocapa con una confluencia de aproximadamente 90%.

5. Ensayo de invasión a la línea celular epitelial HEp-2

Este ensayo se realizó básicamente como describe Lissner y col. (1983), y consiste en poner en contacto 100µl de bacterias crecidas en fase exponencial temprana (densidad óptica aproximada de 0,2 unidades a 600 nm) y resuspendidas en igual volumen de DMEMSF, con una monocapa de células epiteliales preparada el día anterior en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, utilizando una relación de aproximadamente 10 bacterias por célula epitelial HEp-2 (este valor fue previamente establecido en nuestras condiciones de ensayo, Contreras y col., 1995). Se incubaron por una hora, y luego se removieron las bacterias no internalizadas mediante tres lavados con PBS y posterior incubación con 200µg/ml de gentamicina durante dos horas. Luego de tres lavados con PBS para eliminar el antibiótico, se rompieron las células epiteliales con 0,5% de desoxicolato de sodio disuelto en PBS y se hizo recuento de las bacterias

viabiles intracelulares mediante plaqueo de distintas diluciones en placas LB. Los resultados del ensayo fueron expresados como:

$$\text{Indice de Entrada} = 100 \times \frac{\text{cepa mutante (u.f.c. a } t_0 \text{ / u.f.c. agregado)}}{\text{cepa parental (u.f.c. a } t_0 \text{ / u.f.c. agregado)}}$$

6. Determinación de actividad β -galactosidasa

Las mutantes en estudio fueron incubadas bajo distintas condiciones ambientales, hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 0,2 unidades de absorbancia a 600 nm. Luego, los cultivos fueron colocados en hielo por al menos 15min para detener el crecimiento bacteriano. La actividad β -galactosidasa de las mutantes se determinó según el método descrito por Miller (1972). 100 y 200 μ l de cultivo fueron agregados sobre el tampón Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,04M; KCl 0,01M; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001M; β -mercaptoetanol 0,05M; pH 7,0) a un volumen final de 1 ml.

Luego, se permeabilizaron las células agregando 10 μ l de cloroformo, 10 μ l de SDS al 0,1% y agitando fuertemente en Vortex. Se incubó a 30°C por 10min y se agregó 200 μ l de una solución del sustrato orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG) 4mg/ml, preparado en agua bidestilada. Inmediatamente después de agregar el ONPG se cronometró el tiempo que demoró la reacción (aparición de color amarillo), la que fue detenida agregando 0,5ml de Na_2CO_3 1M. La actividad enzimática, expresada como

cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por ml de cultivo, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U. Miller)} = 1000 \times \frac{(\text{Abs } 420\text{nm} - 1,75 \times \text{Abs } 550\text{nm})}{(\text{Volumen} \times \text{Tiempo} \times \text{Abs } 600\text{nm})}$$

7. Técnicas genéticas

7.1. Preparación de lisados

7.1.1. Preparación de lisados del fago P22 HT *int*

Los lisados fueron preparados siguiendo el método descrito por Maloy (1990). Se creció un inóculo de la cepa dadora hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,2 y 0,3 unidades de absorbancia a 600 nm. Se mezcló 1ml de cultivo con 4ml de medio para fago P22 HT *int* (LB suplementado con medio E 1X, glucosa 2g/l y fago P22 HT *int* en una concentración aproximada de 10^{11} Unidades formadoras de placa (UFP)/ml, previamente propagado en la cepa LT2) y se incubó por 8 a 16 horas con agitación vigorosa a 37°C. Los lisados fueron centrifugados por 20min a 3.000xg, filtrados, esterilizados agregando gotas de cloroformo y mantenidos a 4°C hasta el momento de su uso.

7.1.2. Preparación de lisados MudP22

A partir de un inóculo saturado de la cepa lisógena de MudP22, que contiene un plasmidio que codifica el gen 9 para la cola del fago, se inoculó 0,1ml en 5ml de LB suplementado con medio E y glucosa 2g/l. Se incubó con agitación a 37°C por 90 min y se agregó 5µl de Mitomicina C 2mg/ml. Se continuó la agitación durante 3h o hasta observar evidente lisis bacteriana. El lisado fue centrifugado a 13.000xg por 5min para eliminar los restos bacterianos, mientras que el sobrenadante fue esterilizado por adición de unas gotas de cloroformo y mantenido a 4°C.

7.2. Transducciones

Para hacer transducciones entre cepas de *S. typhimurium* se siguió básicamente el protocolo descrito por Maloy, (1990). Para ello, se mezclaron 10µl de un lisado de P22 obtenido a partir de la cepa dadora con 200µl de un cultivo en fase exponencial temprana de la cepa receptora. La mezcla se incubó por 30min a 37°C sin agitación y luego se sembró en placas de agar Luria suplementadas con el (los) antibiótico(s) apropiado(s) para la selección. Cuando la marca a transducir requería expresión fenotípica (resistencias a Kan y Amp), la mezcla se incubó por 30min a 37°C sin agitación. Luego, se agregó 500µl de caldo Luria fresco y se dejó en incubación por 45 min a 37°C con agitación vigorosa, para finalmente sembrar en el medio de selección.

Los clones transductantes obtenidos en *S. typhimurium* fueron aislados y purificados en placas indicadoras EBU (LB suplementadas con glucosa 2,5g/l; K₂HPO₄

5g/l; azul de Evans 1,25mg/l; fluoresceína de sodio 2,5mg/l) para descartar la presencia de bacterias pseudolisógenas de P22. Consecuentemente se descartó la presencia de lisógenos de P22 comprobando la sensibilidad al fago mutante P22 H5 mediante la técnica de líneas cruzadas (Cross-streaking) (Maloy, 1990).

Las transducciones desde *S. typhimurium* a cepas de *S. typhi* se llevaron a cabo usando una alta multiplicidad de infección, como han descrito Zahrt y col., (1994). En este caso no es posible limpiar los clones transductantes como se describió para *S. typhimurium*.

7.3. Localización de las mutaciones en el cromosoma de *S. typhimurium*

A partir de la colección de 50 cepas que contienen el profago MudP22 en posiciones conocidas del genoma de *S. typhimurium*, se obtuvieron los lisados inducidos por Mitomicina C (Benson y Goldman, 1992). Describiendo brevemente, las inserciones MudJ transferidas desde mutantes auxotróficas de *S. typhi* a *S. typhimurium* (mutantes *recBCD mutS hsd*), mediante transformación, fueron llevadas por transducción a una cepa de *S. typhimurium* silvestre. Esta cepa fue esparcida sobre una placa de medio mínimo E. Luego se agregaron 3µl de cada lisado MudP22 (50 en total) sobre la placa y se incubó a 37°C durante 36-48h. La gota del lisado que produce un césped de crecimiento bacteriano indica que la inserción de MudJ original se ubica en una posición cercana a la inserción del MudP22 correspondiente.

Para mapear las mutaciones MudJ que no presentan un fenotipo auxotrófico, fue necesario introducir el marcador de resistencia a Tet. Para esto, se transdujo el marcador *lacZ::Tn10* desde la cepa TT16716, por recombinación homóloga, al interior de MudJ. Una vez obtenida la cepa transductante de *S. typhimurium* con el marcador MudJ modificado, con la inserción Tn10 en *lacZ*, que le confiere el fenotipo Lac⁻, Kan^r y Tet^r, se sembró esta cepa sobre el medio Bochner-Maloy, se agregaron los lisados MudP22 en gotas, se incubó a 42°C durante 48h y se seleccionaron los clones sensibles a Tet. Nuevamente, el lisado que produce un césped bacteriano indica la región del cromosoma donde se encuentra la mutación original.

7.4. Reemplazo de MudJ por MudP22

Se llevó a cabo el reemplazo de MudJ por MudP o MudQ (genéricamente denominados MudP22) mediante una modificación del protocolo descrito por Benson y Goldman (1992). Este reemplazo está basado en el evento de doble recombinación homóloga a través de los extremos izquierdo y derecho de Mu presentes en ambos elementos, MudP22 y MudJ. Se obtuvo MudP y MudQ a partir de la inducción con Mitomicina C de las cepas MST3529 (*thre469::MudP*) y MST3530 (*thre469::MudQ*) como se describió anteriormente. La cepa receptora de la transducción, que posee el marcador MudJ, fue previamente crecida en LB hasta fase exponencial temprana (densidad óptica a 600 nm aproximadamente 0,3). Se tomaron 0,5ml de este cultivo fresco y se agregó 50µl del lisado correspondiente, concentrado o diluído 1/10, se incubó por 30 min a 37°C, luego se centrifugó la mezcla a 3.000xg por 10min, y el sedimento se

lavó una vez con suero fisiológico (NaCl 0,85%). Se resuspendió el sedimento bacteriano en 0,2ml de suero fisiológico y se sembraron gotas de 20µl sobre placas de medio mínimo E suplementado con glucosa 2g/l, Xgal 30mg/l, Cam 40mg/l y se incubó por 36-48h a 37°C. Se escogieron aquellas colonias que incorporaron la marca de resistencia de MudP22 (Cam^r), que crecieran en medio mínimo, indicando fenotipo prototrófico, y que fueran blancas y sensibles a Kan, lo cual indicaba pérdida del marcador MudJ. Se comprobó además que las cepas resultantes fueran lisógenas de MudP22 inducibles por Mitomicina C.

8. Técnicas moleculares

En general, el análisis del DNA incluyendo preparación de DNA plasmidial, digestión con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa y ligaciones fueron realizadas de acuerdo a procedimientos estándares (Sambrook y col., 1989)

8.1. Obtención de DNA plasmidial

Se aisló DNA de plasmidios usando el protocolo descrito por Birnboim and Doly (1979). Se crecieron 5ml de bacteria en caldo Luria suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s), con agitación vigorosa a 37°C durante toda la noche. El cultivo fue centrifugado 20min a 3.000xg, se eliminó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 200µl de tampón de lisis (Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 20mM;

glucosa 50mM) y se dejó por 5min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 400µl de solución desnaturalante preparada en el momento (NaOH 0,2M; SDS 1%), se mezcló suavemente y se dejó en hielo por 10min. Se agregó 300µl de acetato de amonio 7,5M y se dejó en hielo por 10 min, luego de lo cual se centrifugó 20min a 3.000xg. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se agregó un volumen de mezcla fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en Vortex y se centrifugó por 5min a 13.000xg. Se rescató la fase acuosa (superior) en un tubo limpio y se repitió la extracción fenólica hasta obtener una fase acuosa transparente. Posteriormente, se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,1 volumen de Acetato de sodio 3M, se agitó por inversión y se dejó precipitando el DNA por 20min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5min a 13.000xg y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El sedimento se lavó con 500µl de etanol frío al 70%, se eliminó el sobrenadante por aspiración y se secó por vacío. El sedimento fue resuspendido en un volumen apropiado de agua bidestilada estéril y fue mantenido a 4°C hasta el momento de su uso.

8.2. Obtención de DNA cromosomal

El DNA cromosomal fue extraído como describe Ausubel y col., (1992). Se crecieron 3ml de bacteria en caldo Luria, con agitación vigorosa a 37°C durante la noche. El cultivo fue centrifugado 10min a 3.000xg, se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 570µl de tampón TE. Se agregó 10µl de Proteinasa K (10mg/ml), 5µl de RNasa (10mg/ml) y 30µl de SDS al 10%. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 1 hr a 37°C. Luego, se agregó 120µl de NaCl 5M, se agitó

vigorosamente en Vortex y se agregó 80µl de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB 10% en NaCl 0,7M), se agitó nuevamente y se incubó a 65°C durante 10min. Se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó 10min a 13.000xg. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se agregó un volumen de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en Vortex y se centrifugó por 10min a 13.000xg. Se rescató la fase acuosa en un tubo limpio y se repitió la extracción fenólica hasta obtener una fase acuosa transparente. Posteriormente, se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol, se agitó suavemente por inversión y se dejó precipitando el DNA por 20min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10min a 13.000xg y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El sedimento se lavó con 500µl de etanol frío al 70% para eliminar el CTAB residual; se descartó el sobrenadante por aspiración y se secó al aire. El sedimento fue resuspendido en un volumen apropiado de agua bidestilada estéril y fue mantenido a 4°C hasta el momento de su uso. La concentración de DNA fue estimada en geles de agarosa teñidos con Bromuro de etidio por comparación con estándares de concentración conocida. Las muestras de DNA cromosomal fueron agitadas vigorosamente en Vortex durante 3 min antes de ser usadas en la electrotransformación.

8.3. Obtención de DNA de fagos

Se aisló DNA de fagos P22 y sus derivados usando el protocolo descrito por Youderian y col., (1988). A partir de 0,5ml de un lisado concentrado se extrajo con un volumen de cloroformo, luego se agregó 2µl de dietilpirocarbonato, 10µl de SDS 10%,

50µl de Tris-HCl 2M, EDTA 0,5M pH 8.0 y la mezcla se incubó a 65°C por 15min. Se agregó 50µl de KCl 5M, se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 1h. Los complejos de proteínas-SDS fueron microcentrifugados a 4°C por 15min y el DNA presente en el sobrenadante fue precipitado por adición de dos volúmenes de etanol frío. El ovillo de DNA formado fue transferido a un tubo con etanol 70 % para lavarlo, se centrifugó y el precipitado se secó y se resuspendió finalmente en 100µl de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) y se mantuvo a 4°C hasta ser usado.

El análisis de estos DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (Tris-HCl 10mM; pH 8,0; EDTA 1mM; Acetato de sodio 42mM). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio de acuerdo a protocolos estandarizados. La concentración de DNA fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm o estimada en geles por comparación con estándares de concentración conocida (Sambrook y col., 1989).

8.4. Electroporación

Se usó el método descrito por O'Callaghan y Charbit (1990), con algunas modificaciones, para electroporar las cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium*. Las bacterias receptoras fueron crecidas en 75ml de LB hasta fase exponencial tardía a OD₆₀₀ de 0,5, enfriadas en hielo, y cosechadas mediante centrifugación (10.000xg, 5min). Se lavó sucesivamente el sedimento bacteriano con un volumen de glicerol 10% frío, medio volumen y luego un cuarto de volumen. Finalmente se resuspendió el sedimento en

250µl de glicerol 10%, se alicuotó en tubos Eppendorf (50µl), se congelaron en Nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta ser usados. Para la electroporación se añadió 5-10 µl de DNA cromosomal (1-5 µg) o 5µl de plasmidio (50 ng) a cada alícuota de bacterias competentes previamente descongeladas, y se mantuvo la mezcla en hielo (el DNA cromosomal fue vigorosamente agitado en vortex antes de ser usado). Se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación mantenida en hielo (abertura del electrodo 0,2cm). Se usó un pulso de 12,5kV/cm (2,5kV; 200Ω; 25µF) y se transfirió la mezcla rápidamente a un tubo de vidrio que contenía 1ml de medio SOC, que se incubó durante 60min a 37°C antes de plaquear en el medio selectivo. Se hizo al mismo tiempo un recuento de las bacterias viables después de la electroporación, mediante dilución en serie en placas LB.

8.5. Análisis de hibridación mediante Southern blot:

8.5.1. Southern blot radiactivo

El DNA cromosomal de las cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium* fue digerido con EcoRI y separado por electroforesis en geles de agarosa por procedimientos estándar (Maloy, 1990). El DNA fue transferido a membranas Hybond N (Amersham) e hibridado en condiciones de alta estrictez (como se describe en Sambrook y col., 1989) con el plasmidio pCV47, que contiene el operón *leu* silvestre de *S. typhimurium*. Esta sonda fue marcada con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP mediante el kit comercial para "nick translation" de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham International, Amersham,UK).

8.5.2. Southern blot no radiactivo

El DNA cromosomal fue digerido con EcoRI y separado por electroforesis en geles de agarosa al 1,0 % en tampón TAE. Se transfirió el gel a membrana de Nylon y se hibridó con dos sondas del fago MudJ obtenidas desde el plasmidio pJP317. La primera sonda corresponde al fragmento HindIII/PstI de MudJ de aproximadamente 8 kb, obtenido desde el plasmidio pJP317. Este fragmento contiene el operón *lac* completo y reconoce dos bandas cuando MudJ es digerido con EcoRI. La segunda sonda corresponde al fragmento HindIII/BamHI que contiene el gen de resistencia a Kan, obtenido del mismo plasmidio pJP317 y es de 2kb. Esta sonda reconoce sólo una banda al digerir MudJ con EcoRI. Para revelar la membrana se usó el sistema quimio-luminiscente de acuerdo a las instrucciones del kit Photogene Detection System (Gibco BRL). Se usó como solución de pre-hibridación e hibridación $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M, pH 7,2; SDS 7% y EDTA 1mM en condiciones de alta estrictez a 65°C. Se incubó la membrana en solución de pre-hibridación previamente calentada a 65°C por 2h. Se descartó la solución de pre-hibridación y se incubó la membrana toda la noche en solución de hibridación con la sonda marcada, previamente calentada a 65°C. Se descartó la solución de hibridación y se lavó en condiciones de alta estrictez con $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M, pH 7,2; SDS 2% y EDTA 1mM, una vez a temperatura ambiente y luego dos veces a 65°C, por 15min cada vez. La sonda fue marcada por incorporación de nucleótidos biotinilados mediante "random primer" de acuerdo a las instrucciones del kit BioPrime (Gibco BRL). La membrana fue lavada según las instrucciones del fabricante, para ser hibridada con la siguiente sonda.

8.6. Secuenciación

Se usó una modificación del método de secuenciación clásico basado en la reacción de terminación de cadena. Éste consiste en múltiples ciclos de secuenciación usando una DNA polimerasa termoestable, y se inicia con la desnaturación del DNA templado por calor, alineamiento del partidor, extensión del partidor por la DNA polimerasa termoestable en cada molécula de templado hasta que un didesoxinucleótido es incorporado a la cadena. La doble hebra es nuevamente desnaturada, lo cual permite un nuevo ciclo de alineamiento y síntesis. Este proceso se repite por 20 a 30 ciclos y los fragmentos obtenidos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea y revelados mediante autoradiografía. Para ello se usó el kit SEQUENASE de PROMEGA. Para secuenciar DNA de fago se usó el kit *fmoI* DNA Sequencing System de PROMEGA, siguiendo las indicaciones del fabricante y se marcaron los partidores con [γ - ^{32}P]ATP (3 $\mu\text{Ci}/\text{pmol}$). La mezcla de reacción, que contenía 1,5pmol del partidor, 40fmol de DNA templado (aproximadamente 1,3 μg de DNA de fago) y 5U de Taq polimerasa, fue dividida en 4 tubos que contenían los cuatro desoxinucleótidos más uno de ellos como didesoxinucleótido. La reacción de amplificación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo: 2min a 95°C para desnaturar y 30 ciclos de desnaturación por 30s a 95°C, alineamiento por 30s a 42°C y extensión por 1min a 70°C. La mezcla de reacción se calentó a 70°C por 2min y se aplicó en un gel de acrilamida :bisacrilamida (19:1)-urea 8M en tampón TBE (Tris base 89mM; H₃BO₃ 89mM; Na₂EDTA 2mM; pH 8,3). El gel fue corrido a 60 watts constante durante 2-3 h y luego procesado para autorradiografía.

8.7. Reacciones de amplificación por PCR

Los siguientes partidores fueron diseñados para ser usados tanto en las reacciones de secuenciación como de amplificación.

Mu-L :	5'-TTC GTA CTT CAA GTG AAT-3'	(18 mer)
Mu-R :	5'-TTC GCA TTT ATC GTG AAA CGC TTC C-3'	(25 mer)
900-L:	5'-CCC AAT GAT CCG TCG CCA GCG TG-3'	(23 mer)
900-R:	5'-GGA TTG CAT CCG GAC CGT ACT TC-3'	(23 mer)
fdh-11	5'-TCG TCA CGG TTT GCC CCT ATT-3'	(21 mer)

Cada reacción de amplificación contenía 50 pmol de cada partidor; dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno 0,8mM; MgCl₂ 1,5mM; Taq Polimerasa 2U, y aproximadamente 100ng de DNA cromosomal en un volumen final de 50µl. Se incubó la mezcla de reacción en un termociclador durante 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1min), alineamiento de los partidores (56°C, 30s), extensión (72°C, 30s) seguido de una incubación a 72°C por 10min. Se guardaron las muestras a 4°C y una alícuota de 10µl fue separada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE.

RESULTADOS

1. Desarrollo de un método de transferencia de marcadores cromosomales desde *S. typhi* a *S. typhimurium*

Un punto de partida para la caracterización genética de una mutante es la transferencia de la mutación a un genotipo silvestre ("backcross"). Este procedimiento permite verificar, en un contexto genético silvestre, la correlación existente entre la mutación y el fenotipo observado en la mutante original. Una de las herramientas más poderosas para el desarrollo de la genética de una determinada especie bacteriana es la existencia de fagos transductores generalizados, que permiten transferir marcadores cromosomales de una bacteria a otra en tan sólo una etapa. Para *S. typhi* se han descrito algunos fagos transductores generalizados, pero éstos requieren como receptor el antígeno Vi. No todas las cepas de *S. typhi* expresan este antígeno, hecho que limita su utilidad. Por esto, fue necesario desarrollar un método alternativo al uso de fagos transductores, que permitiera transferir marcadores cromosomales desde *S. typhi* a otra *S. typhi* o a *S. typhimurium*.

!

1.1. Transformación de *S. typhimurium* con DNA plasmidial lineal

Estudios desarrollados en *E. coli* han demostrado que al transformar con plasmidios linealizados, es posible integrar al cromosoma un segmento de DNA clonado

en este plasmidio, mediante recombinación homóloga. Este procedimiento requiere que la cepa receptora contenga alguna mutación en genes que codifican para el complejo RecBCD que inactive la enzima Exonucleasa V (ExoV), previniendo de esta forma, la degradación del DNA. Mutantes en la ExoV, del tipo *recD* y *recBC sbcB* en *E. coli* han sido utilizadas con éxito para transformar con DNA lineal (Kushner y col., 1972; Russel y col., 1989).

Para probar si *S. typhimurium* puede ser transformada con DNA plasmidial lineal, se llevaron a cabo transformaciones con el plasmidio pCV47 (Squires y col., 1983), que contiene un inserto BamHI de aproximadamente 18 kb, dentro del cual está codificado el operón *leu* de *S. typhimurium*. Se usaron como receptoras las cepas que contienen la inserción MudJ en el gen *leuA*, que les confiere el fenotipo auxotrófico para leucina, además de Kan^r y Lac⁺, propias de MudJ. Éstas fueron (Tabla 1): MA1449 (*leuA recBCD*⁺) y dos mutantes distintas en la actividad ExoV: MA5133 (*leuA recD*), que lleva una inserción Tn10dTet en el gen *recD*; y MA5031 (*leuA recBD sbcE*), que tiene una delección de los genes *recBD* pero es capaz de recombinar debido a la mutación supresora *sbcE21* (Gari y col., 1996). Se escogió el marcador *leu* debido a la facilidad de selección para un marcador genético de auxotrofia y a la disponibilidad del gen silvestre clonado en el plasmidio pCV47. Se electroporó con preparaciones del plasmidio circular y lineal digerido con BamHI, de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina (Amp^r) en placas LB y las transformantes Leu⁺ Lac⁻ en placas de medio mínimo E suplementadas con Xgal.

Seleccionando clones Amp^r, que corresponde al marcador del vector, se observó que la eficiencia de transformación con el plasmidio pCV47 en su forma circular, fue en general, similar para las tres cepas, (Tabla 2). Se obtuvo en general, entre 600 y 1100 transformantes por 10⁹ bacterias viables después de la electroporación, tanto para las mutantes carentes de la actividad ExoV (MA5133, MA5031) como para la cepa que posee la actividad ExoV (MA1449). Al seleccionar cepas Amp^r cuando se transformó con el plasmidio linealizado con BamHI, se detectaron algunas transformantes, entre 25 y 30 unidades formadoras de colonias (UFC) /10⁹ bacterias viables después de la electroporación, para todas las receptoras de la transformación. Probablemente estos clones surgieron por la presencia de formas circulares del plasmidio debido a digestión incompleta o tal vez por recircularización del mismo en la cepa receptora. Lo más importante de estos resultados es que indican que mutaciones en la actividad ExoV no alterarían la capacidad de las cepas de internalizar el DNA plasmidial.

Al usar pCV47 lineal (digerido con BamHI) y seleccionar en medio mínimo, sólo se obtuvo transformantes Leu⁺ cuando las receptoras presentaban mutaciones en el complejo *recBCD*. Considerando el ejemplo presentado en la Tabla 2, se registraron 38 transformantes para la cepa *leuA recD* y 1292 transformantes para la cepa *leuA recBD sbcE*. Las transformantes fueron además sensibles a Kan y Amp, hecho que sugiere fuertemente que el gen *leuA* silvestre, contenido en el plasmidio, fue integrado en el genoma de la bacteria receptora mediante recombinación homóloga y por lo tanto reemplazó al gen mutado. La eficiencia de la transformación fue casi 30 veces más alta

TABLA 2. Transformación de cepas de *S. typhimurium* con DNA plasmidial

Cepa receptora	Genotipo relevante	Nº de transformantes*	
		Plasmidio circular ^a	Plasmidio lineal ^b
MA1449	<i>leuA</i>	604	0
MA5133	<i>leuA recD</i>	1100	38
MA5031	<i>leuA recBD sbcE</i>	633	1292

*: los resultados se presentan como Nº de UFC transformantes por 10^9 bacterias viables después de la electroporación, usando 50ng de plasmidio circular y 1µg de plasmidio lineal. Los valores corresponden a un experimento representativo.

a: UFC resistentes a Amp, seleccionadas en placas de agar LB Amp 50µg/ml

b: UFC prototróficas, Lac⁻, seleccionadas en placas de medio mínimo E suplementado con X-gal. Luego de la selección, se chequeó que las transformantes fueran sensibles a Kan y Amp.

en la cepa *recBD sbcE* respecto a la mutante *recD*, resultado que es consistente con el fenotipo hiperrecombinogénico descrito para la doble mutante (Gari y col., 1996). Al electroporar las cepas sin DNA como control, no se obtuvieron cepas *LeuA*⁺, lo cual indica que el evento de escisión precisa del elemento *MudJ*, que podría restituir el fenotipo silvestre, es poco probable. Este evento ha sido detectado cuando el derivado de *Mu* estudiado contiene las transposasas (Nag y Berg, 1987; Foster y Cairns, 1994).

1.2. Transformación de *S. typhimurium* con DNA cromosomal lineal

1.2.1. Transformación con DNA homólogo, de *S. typhimurium*

Para facilitar la transferencia de marcadores cromosomales mediante transformación, fue necesario eliminar la etapa de clonamiento del marcador en un plasmidio. Por esto, se estudió la posibilidad de usar directamente el DNA cromosomal de la cepa que contiene el gen que se desea transferir.

Se usó el grupo de mutantes *leuA* descritas en el punto anterior como receptoras, para determinar la eficiencia de transformación usando DNA cromosomal de *S. typhimurium* silvestre, como dador del gen *leuA* silvestre. Las preparaciones de DNA cromosomal fueron agitadas vigorosamente antes de la electroporación, para generar mecánicamente fragmentos lineales al azar, sin uso de endonucleasas de restricción. Luego de electroporar y seleccionar el fenotipo *Leu*⁺, se observó que sólo las mutantes en la actividad enzimática *ExoV* fueron transformadas con DNA fragmentado. En la Tabla 3 se muestra el promedio de tres ensayos independientes, donde se observa que

TABLA 3. Transformación de cepas de *S.typhimurium* con DNA cromosomal lineal

Cepa receptora	Genotipo relevante	N° de transformantes*	
		Origen del DNA transformante	
		<i>S. typhimurium</i> LT2	<i>S. typhi</i> Ty2
MA1449	<i>leuA</i>	0	0
MA5114	<i>leuA mutS</i>	0	1
MA5133	<i>leuA recD</i>	21	0
MA5116	<i>leuA recD mutS</i>	12	4
MA5031	<i>leuA recBD sbcE</i>	41	1
MA5145	<i>leuA recBD sbcE mutS</i>	33	17

*: los resultados se expresan como UFC transformantes prototróficas Lac⁻ por 10⁹ bacterias viables después de la electroporación, obtenidas usando 2 µg de DNA cromosomal. Los valores corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

hubo 21 transformantes para la cepa *recD* y 41 transformantes para la cepa *recBD sbcE*. Un resultado similar fue obtenido cuando se usó el marcador *hisD::MudJ* en las cepas receptoras de la transformación, con frecuencias de transformación del mismo orden de magnitud (resultados no mostrados).

1.2.2. Transformación con DNA heterólogo, de *S. typhi*

La transformación de las cepas de *S. typhimurium* con DNA cromosomal de *S. typhi* fue prácticamente nula, aún en presencia de mutaciones en el complejo RecBCD, obteniendo sólo 1 transformante con la cepa *recBD sbcE* (Tabla 3).

Es sabido que durante los eventos de conjugación, transducción y transformación, el sistema de reparación "mismatch" (*mutHSL*) impide la recombinación entre secuencias parcialmente homólogas, convirtiéndose en una barrera funcional de la recombinación interespecies (Rayssiguier y col., 1989; Matic y col., 1995; Zahrt y col. 1994). En consecuencia, se estudió si la anulación de este sistema podía mejorar la eficiencia de la transformación de *S. typhimurium* con DNA de *S. typhi*. Se transdujo por lo tanto, la mutación *mutS::Tn10dCam* a las cepas receptoras de la transformación (Tabla 3).

En primera instancia, se transformaron las mutantes *mutS* de *S. typhimurium* con DNA homólogo. No hubo transformantes cuando se usó la mutante *mutS* MA5114. Analizando los valores promedio obtenidos para tres ensayos independientes, se observó que la introducción de la mutación *mutS* en las mutantes *recBCD* disminuyó levemente

la eficiencia transformación obtenida con DNA cromosomal homólogo, respecto a las mutantes que presentan el gen *mutS* silvestre (de 21 a 12 transformantes para el caso de la mutante *recD*, y de 41 a 33 transformantes cuando se usó la mutante *recBD sbcE*). Sin embargo, al transformar con DNA de *S. typhi*, se obtuvo 1 transformante *Leu*⁺ con la cepa *mutS*, lo que indicaría que la eliminación de la actividad de reparación "mismatch" debida a la mutación *mutS*, por sí sola, favorece el evento de recombinación homóloga entre *S. typhimurium* y *S. typhi*, aunque con baja eficiencia (Tabla 3). Al mismo tiempo se observó un aumento en la frecuencia de transformación en aquellas mutantes que contenían ambas mutaciones *mutS* y *recBCD*, obteniendo 4 y 17 transformantes, respecto a las cepas que tienen mutaciones sólo en el complejo RecBCD, con las cuales se obtuvo sólo 1 transformante (Tabla 3). Nuevamente la cepa receptora más eficiente resultó ser la mutante *recBD sbcE*.

1.3. Transformación con DNA de mutantes de *S. typhi*

En los ensayos anteriores se determinó la posibilidad de transferir por transformación un gen silvestre desde *S. typhi* a *S. typhimurium*. En esta etapa, se estudió la posibilidad de transformar *S. typhimurium* con DNA de *S. typhi* conteniendo MudJ. Para ello, se generaron mutantes de *S. typhi* con marcadores auxotróficos conocidos, por transducción desde cepas de *S. typhimurium* previamente caracterizadas: MA463 (*hisC::MudJ*), DEH53 (*proU::MudJ*) y MA1449 (*leuA::MudJ*). Se obtuvieron así las cepas TyT2123, TyT2124 y TyT2132 respectivamente, que además de la auxotrofia presentaban los marcadores de MudJ: resistencia a Kan y actividad Lac

positiva. Se preparó DNA cromosomal de estas mutantes de *S. typhi* para luego transformar *S. typhimurium*.

Como receptoras se usaron cepas de *S. typhimurium* que presentaban mutaciones en los sistemas de reparación "mismatch" y en la actividad ExoV (Tabla 4): LT2 (*recD*⁺ *mutS*⁺) como control; MA5098 (*recD mutS*) y MA5100 (*recBD sbcE mutS*). Se transformó y se seleccionaron clones resistentes a Kan y Lac⁺, luego se confirmó el fenotipo auxotrófico de cada clon. Usando el DNA de *S. typhi hisC::MudJ* (TyT2123) no se obtuvo transformantes, pero usando los DNA de *S. typhi proU::MudJ* (TyT2124) y *leuA::MudJ* (TyT2132) fue posible obtener transformantes con las receptoras MA5098 y MA5100, correspondientes a las cepas mutantes en *recBCD* y *mutS* simultáneamente. No obstante, la eficiencia en estas transformaciones fue baja, de 1 a 2 transformantes/10¹⁰ bacterias viables después de la electroporación.

Se escogieron dos transformantes de *S. typhimurium leuA::MudJ*, obtenidas al usar DNA de la mutante de *S. typhi* TyT2132 (*leuA::MudJ*), una proveniente de la cepa MA5098 y otra de la cepa MA5100, denominadas MA5368A y MA5368B, respectivamente. El marcador *leuA::MudJ* de estas cepas se transdujo mediante P22 HTint a *S. typhimurium* silvestre, confirmando en este contexto genético el fenotipo Leu⁻, Lac⁺ y Kan^r que se esperaba por la inserción MudJ en *leuA*. En la Figura 1a se muestra un esquema de esta transferencia usando una inserción MudJ en un gen X.

TABLA 4. Transformación de cepas de *S.typhimurium* con DNA cromosomal de mutantes *S. typhi* ::MudJ auxotróficas

Cepa receptora <i>S. typhimurium</i>	Genotipo relevante	N° de transformantes*		
		DNA de mutantes de <i>S. typhi</i>		
		<i>hisC</i> ::MudJ	<i>proU</i> ::MudJ	<i>leuA</i> ::MudJ
LT2	silvestre	0	0	0
MA5098	<i>recD mutS</i>	0	1	1
MA5100	<i>recBD sbcE mutS</i>	0	1	2

*: los resultados se expresan como N° de transformantes Kan^r Lac⁺ por 10¹⁰ bacterias viables después de la electroporación, usando 2,5 µg de DNA cromosomal. Los valores corresponden a un experimento representativo

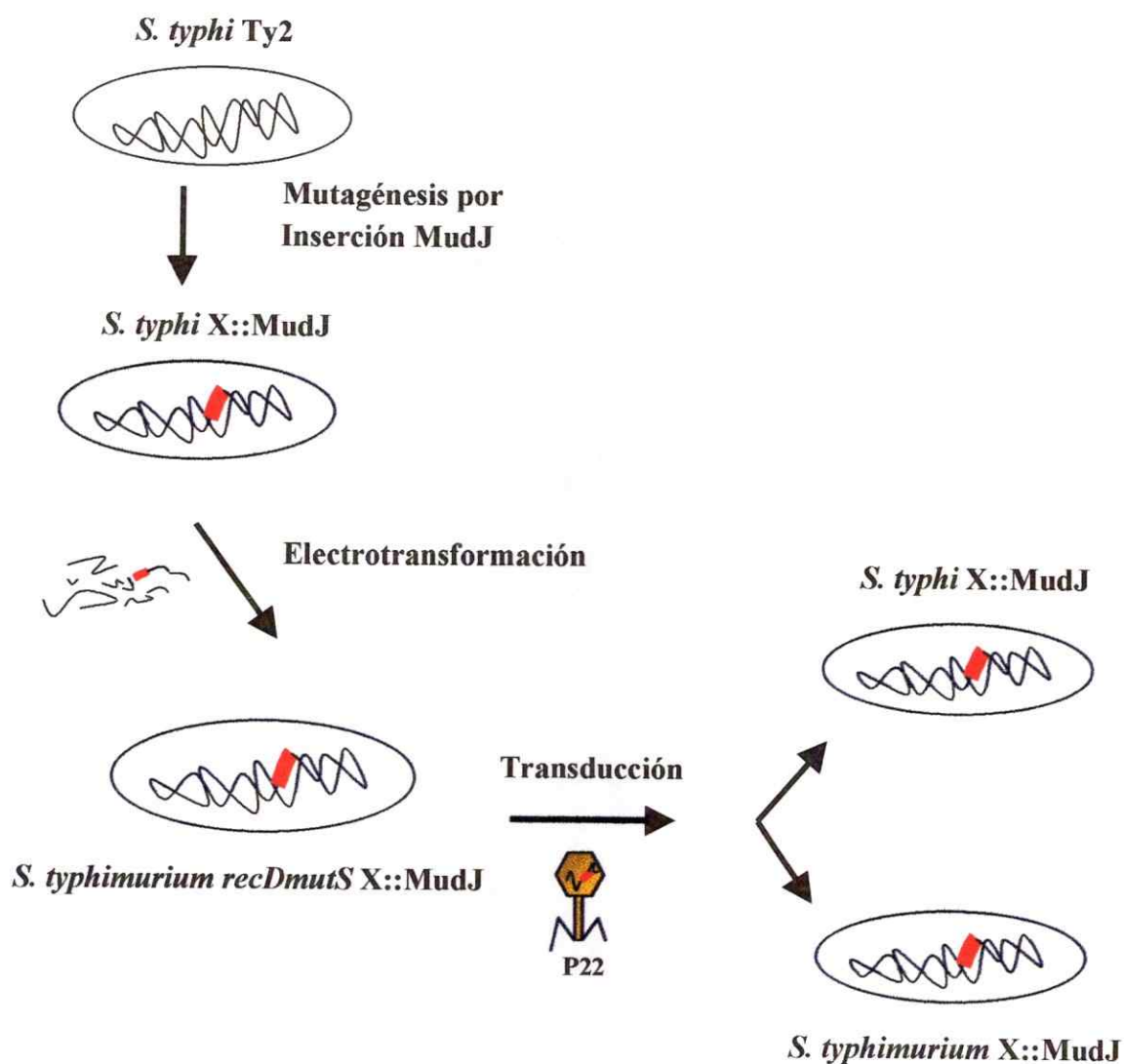


Figura 1a. Transferencia de marcadores cromosomales entre *S. typhi* y *S. typhimurium*. Se muestra un esquema que resume la metodología de transferencia del marcador MudJ (representado en color rojo) mediante electrotransformación, usando DNA cromosomal de una mutante de *S. typhi*. La incorporación del marcador al cromosoma de la cepa receptora *S. typhimurium* recDmutS se lleva a cabo por eventos de recombinación homóloga entre el gen que lleva la inserción MudJ (X::MudJ) y el gen silvestre presente en la cepa receptora. Luego se transduce el marcador desde esta mutante de *S. typhimurium* con el fago P22, tanto a *S. typhimurium* como a *S. typhi* silvestre. De esta forma, se logra el "backcross" de la mutación en *S. typhi*.

pCV47

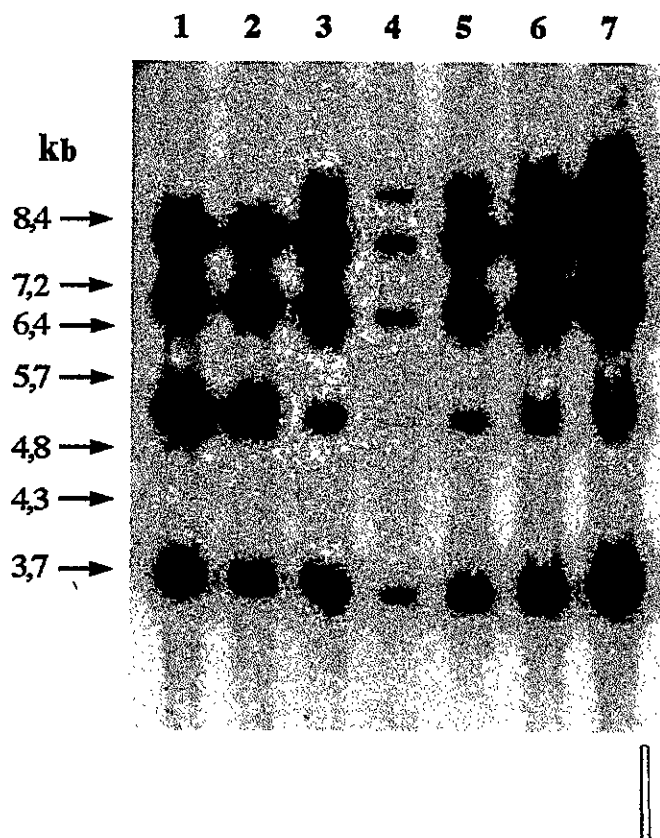
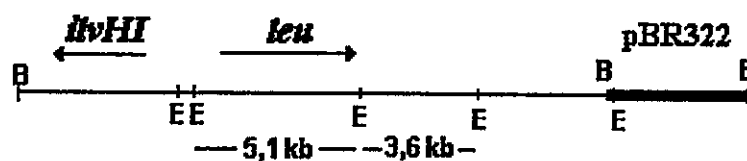


Figura 1b. Análisis de hibridación Southern para el marcador *leuA::MudJ*. Se muestra un esquema del plasmidio pCV47, que fue usado como sonda. El fragmento de 18 kb clonado en este plasmidio contiene el operón *leu* de *S. typhimurium*. Se destaca el mapa de restricción con las enzimas BamHI (B) y EcoRI (E). Para la hibridación, se obtuvo DNA cromosomal de las distintas cepas y se digirió con EcoRI; los fragmentos fueron separados en gel de agarosa al 1% y transferidos a membrana de nylon. Los carriles contienen DNA aislado de las siguientes cepas: 1, *S. typhi* Ty2; 2, *S. typhimurium* LT2; 3, *S. typhimurium* MA1449 (*leuA::MudJ*); 4, *S. typhi* TyT2132 (*leuA::MudJ*); 5, *S. typhimurium* MA5368A (*leuA::MudJ*, obtenida por transformación); 6, *S. typhimurium* MA5368B (*leuA::MudJ*, obtenida por transformación); 7, *S. typhimurium leuA::MudJ* (obtenida por transducción desde la cepa MA5368A). Se señala con flechas la migración de los fragmentos correspondientes al estándar λ /BstEII.

1.4. Análisis del marcador *leuA::MudJ* mediante hibridación Southern.

Para determinar si el marcador *leuA::MudJ* efectivamente se integró en una región homóloga en el cromosoma de las cepas a las cuales se transfirió, se comparó el patrón de restricción EcoRI del DNA cromosomal de cada una de las cepas mediante Southernblot, usando como sonda el plasmidio pCV47 completo. Se muestra en la Figura 1b un esquema del plasmidio pCV47, que contiene el operon *leu* silvestre de *S. typhimurium* y su mapa de restricción EcoRI. Se observa en el autoradiograma que *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres presentaron patrones de restricción similares en la zona del operón *leu*, con 4 bandas reconocidas por la sonda (Fig. 1b, carril 1 y 2), lo cual indicaría que no existen diferencias en la región *leu*, detectables por este método. Al comparar el patrón de restricción con la endonucleasa PstI, tampoco se detectaron diferencias entre *S. typhi* y *S. typhimurium*.

MudJ presenta un sitio de corte con la endonucleasa EcoRI en su secuencia, lo cual modifica el patrón de restricción de las mutantes respecto a las cepas silvestres. La banda de aproximadamente 5,1kb, donde está inserto el MudJ, desapareció generando una banda de 5kb y una de 11,5 kb aprox. (Fig: 1b, carriles 3 a 7). Se observó el mismo patrón tanto en la cepa mutante de *S. typhi* que fue la dadora del marcador *leuA::MudJ* durante la transformación (Fig. 1b, carril 4), como en las cepas de *S. typhimurium* mutantes obtenidas por transformación (Fig. 1b, carril 5 y 6). Lo mismo se observó para la cepa obtenida por transducción desde una de las transformantes (Fig. 1b, carril 7). Este resultado sugiere por lo tanto que la inserción del marcador *leuA::MudJ* fue debida a recombinación homóloga, sin alteraciones como reordenamientos o deleciones detectables por este análisis.

1.5. Eficiencia de transformación en mutantes del sistema de restricción *hsd*

Considerando que *S. typhi* y *S. typhimurium* son especies distintas, cuyo material genético difiere en 1-2% (Sharp, 1991), se estudió si la anulación del sistema de restricción de *S. typhimurium* dependiente de los genes *hsd*, podría aumentar la baja eficiencia de transformación con DNA cromosomal lineal de *S. typhi* detectada hasta este momento. Así, se introdujeron las mutaciones *recD* y *mutS* en la cepa SL4213, *S. typhimurium* mutante en *hsd*. Se construyeron las cepas MA5379 (*hsd mutS*), MA5380 (*hsd recD*) y MA5383 (*hsd mutS recD*) como receptoras de transformación (Tabla 1). La mutante *recBD sbcE* no pudo ser incluida en este grupo debido a que estas mutaciones no fueron transferibles por transducción. Este grupo de mutantes fue transformado con DNA cromosomal de las cepas auxotróficas de *S. typhi* TyT2123 (*hisC::MudJ*), TyT2124 (*proU::MudJ*) y TyT2132 (*leuA::MudJ*).

Usando la cepa SL4213 como receptora (mutante del sistema de restricción tipo I, *hsd*), no se obtuvo transformantes. Esta vez, sin embargo, al transformar la triple mutante *hsd recD mutS* con el DNA de la cepa *hisC::MudJ* fue posible obtener transformantes. Respecto a la eficiencia obtenida con el DNA cromosomal de las cepas mutantes de *S. typhi* *proU::MudJ* y *leuA::MudJ*, se logró un aumento de 10 veces respecto a la obtenida con las cepas que no poseían la mutación *hsd*. Esto sugiere por lo tanto que, por un lado, el sistema *hsd* defectuoso por sí solo no es suficiente para permitir la transformación con DNA lineal, y por otro lado que en conjunto con las mutaciones *recD* y *mutS* aumenta la eficiencia de transformación cuando se usa DNA cromosomal lineal de *S. typhi*.

1.6. Localización de la mutación en cepas auxotróficas de *S. typhi*

Una vez demostrado que la transferencia de determinantes de resistencia desde *S. typhi* a *S. typhimurium* mediante transformación, es un evento factible y que consecuentemente se transfiere el fenotipo asociado a la mutación, se estudió si era posible extender este procedimiento a otras mutantes de *S. typhi* por inserción de MudJ.

A partir de una colección de mutantes auxotróficas de *S. typhi* obtenidas en nuestro laboratorio por inserción al azar de MudJ y seleccionadas por el fenotipo, se escogieron 5 mutantes para las cuales se desconocía la ubicación de la inserción MudJ (Tabla 1): TyT1009, Metionina⁻ (Met⁻); TyT1015, Arginina⁻ (Arg⁻); TyT1020, Isoleucina⁻ (Ilv⁻); TyT1031, Leucina⁻ (Leu⁻); y TyT1041, Fenilalanina⁻ (Phe⁻). Se extrajo el DNA cromosomal de ellas para transformar la cepa *S. typhimurium* MA5383 (*recD mutS hsd*), que fue la cepa receptora que presentó mayor eficiencia de transformación. La marca MudJ de las transformantes obtenidas (Lac⁺, Kan^r) fue transferida a *S. typhimurium* silvestre (LT2) mediante transducción con P22 HTint. Se verificó en estas cepas que la auxotrofia correspondiente también fuera transferida a la cepa silvestre de *S. typhimurium*.

A continuación, se mapeó el gen de *S. typhi* en la cepa de *S. typhimurium* resultante, de acuerdo al mapa descrito para *S. typhimurium* (Sanderson y col., 1995). Para ello se usó la colección de lisados MudP22, construida por Benson y Goldman, 1992 (Tabla 5). Se ubicó la región del cromosoma donde se encuentra la inserción MudJ que abarca dos a tres minutos, por la resolución del método. Para el caso de la cepa Met⁻, cuya inserción MudJ fue ubicada en la región del minuto 67 al minuto 69, se pudo

TABLA 5. Localización cromosomal de inserciones MudJ en mutantes de *Salmonella typhi* ^a

Cepas <i>S. typhi</i> ^b	Fenotipo Relevante	Señal Mud-P22 Positiva	Posición Relativa (cs)	Probable Gen Involucrado
TyT1009	Met ⁻	<i>zgf-1716::MudP</i>	67-69	<i>mefC</i>
TyT1015	Arg ⁻	<i>cysH/J1574::MudQ</i>	64-66	<i>argA</i>
TyT1020	Ilv ⁻	<i>metE2131::MudP</i>	85-86	operón <i>ilv</i>
TyT1031	Leu ⁻	<i>nadC218::MudQ</i>	1-3	operón <i>leu</i>
TyT1041	Phe ⁻	<i>purG2149::MudP</i>	56-58	<i>pheA</i>
NN19	resistente a clorato	<i>cobD498::MudP</i>	16-19	<i>modC</i>
JJ3	resistente a clorato	<i>nadA219::MudP</i>	17-19	<i>moaA</i>
DD46	resistente a clorato	<i>zgf-1716::MudQ</i>	67-69	<i>uxaC</i> ^c
C17	Lac ⁺ Kan ^r	<i>melAB396::MudQ</i>	91-93	<i>felhF</i> ^c

a: La inserción MudJ de cada mutante de *S. typhi* fue transferida mediante electroporación a la mutante *hsd recD mutS* de *S. typhimurium* y posterior transducción a *S. typhimurium* LT2. Se localizó la inserción en estos derivados usando la colección de lisados MudP22 como se explica en Materiales y Métodos.

b: se muestran dos grupos de mutantes de *S. typhi*, las cepas TyT presentan fenotipo auxotrófico y el otro grupo presenta un fenotipo *lac* inducido en anaerobiosis y defectuosas en la invasión a células HEp-2 in vitro.

c: la identidad de estos genes fue obtenida después de secuenciar las regiones cromosomales adyacentes a la inserción MudJ.

asociar la auxotrofia al gen *metC*, que se encuentra en el minuto 69,1 del cromosoma de *S. typhimurium*. La mutante Arg⁻ presentó una inserción en la región que comprende los minutos 64 al 66, que podría indicar una inserción en el gen *argA*, mapeado en el minuto 65,1. Por último, la cepa Phe⁻, al parecer presenta la inserción MudJ en el gen *pheA*, puesto que mapeó en la región entre el minuto 56 y 58 en el mapa de *S. typhimurium* y este gen se encuentra en el minuto 58,3. Para las cepas Ilv⁻ y Leu⁻ sólo se pudo sugerir un operón completo, puesto que con estos resultados no fue posible discriminar más finamente. De esta forma, la mutante auxotrófica para isoleucina, mapeada en la región comprendida entre los minutos 85 y 86, debería presentar la inserción en algún gen del operón *ilv* ubicado en el minuto 85,2. Por su parte, la mutante auxotrófica para Leu, cuya inserción fue ubicada en la región del minuto 1 al minuto 3 del cromosoma de *S. typhimurium*, probablemente presente la inserción en el operón *leu* ubicado en el minuto 2,9.

De esta forma, se probó la utilidad del método de transferencia de un marcador MudJ desde *S. typhi* a una cepa de *S. typhimurium*, lo cual permite por un lado mapear la inserción en cuestión, y por otro lado permite transferir la mutación mediante transducción a la cepa de *S. typhi* silvestre, completando en forma indirecta el "backcross", que fue uno de los objetivos del desarrollo de este método (Toro y col., 1998).

1.7. Transformación usando cepas de *S. typhi* como receptora

Explorando otra alternativa de transferencia de marcadores cromosomales entre cepas de *S. typhi*, se estudió la posibilidad de transformar con DNA cromosomal cepas receptoras mutantes en los sistemas *recD* y *mutS* de *S. typhi* directamente. De esta forma, se eliminaría la etapa intermedia de transferencia del marcador a una cepa de *S. typhimurium*, requerido por el método planteado anteriormente.

Con este objetivo, se prepararon las mutantes Ty2 *recD*, Ty2 *mutS* y Ty2 *recDmutS*, mediante transducción de las mutaciones usadas en este trabajo. Se evaluó la eficiencia de transformación con DNA de las cepas de *S. typhi* auxotróficas obtenidas por transducción desde *S. typhimurium*: TyT2123 (*hisC::MudJ*), TyT2124 (*proU::MudJ*) y TyT2132 (*leuA::MudJ*). Se electroporaron las cepas Ty2, Ty2 *recD*, Ty2 *mutS* y Ty2 *recDmutS*, usando las condiciones descritas para las cepas de *S. typhimurium*. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

En líneas generales, se puede observar que la mutante Ty2 *recDmutS* presenta la mayor eficiencia de transformación, cualquiera sea el marcador que se transfiere, resultado similar a lo detectado usando *S. typhimurium* como receptora. Por otro lado, la mutación *mutS* por sí sola favoreció la obtención de transformantes. Este resultado podría reflejar el hecho que las cepas de *S. typhi* auxotróficas son en realidad híbridos, cuyo marcador auxotrófico proviene de *S. typhimurium*.

TABLA 6. Transformación de cepas de *S.typhi* con DNA cromosomal de mutantes *S. typhi* ::MudJ auxotróficas

Cepa receptora <i>S. typhi</i>	Nº de transformantes*		
	DNA de mutantes de <i>S. typhi</i>		
	<i>hisC</i> ::MudJ	<i>proU</i> ::MudJ	<i>leuA</i> ::MudJ
silvestre	1	0	5
<i>mutS</i>	5	3	8
<i>recD</i>	1	1	10
<i>recD mutS</i>	20	15	41

*: los resultados se expresan como Nº de transformantes Kan^r Lac⁺ por 10¹⁰ bacterias viables después de la electroporación, usando 2,5 µg de DNA cromosomal. Se muestra un experimento representativo de al menos 6 ensayos independientes. El fenotipo auxotrófico fue corroborado para cada transformante.

Lo más sorprendente de estos ensayos fue el hecho que *S. typhi* Ty2 silvestre, usada en principio como control negativo, fuera transformada con el DNA lineal de las cepas auxotróficas *hisC* y *leuA*.

Considerando estos resultados, se transformó con DNA de cepas mutantes de *S. typhi* obtenidas directamente por mutagenización con MudJ, y se lograron resultados semejantes, es decir, se obtuvo transformantes con las mutantes en los sistemas *recD* y *mutS*, pero también hubo transformantes usando la cepa silvestre como receptora. De esta forma, se pudo llevar a cabo la transferencia directa de un marcador de *S. typhi* a *S. typhi* silvestre, sin necesidad de usar cepas intermediarias.

2. Caracterización del fenotipo invasor de *S. typhi* a la línea celular HEp-2

2.1. Caracterización del fenotipo invasor de *S. typhi* silvestre

S. typhi es capaz de invadir células epiteliales en cultivo y también células M derivadas de ratón (Kohbata y col., 1986; Mroczenski-Wildey y col., 1989; Mills y Finlay, 1994). Ambos tipos celulares están presentes en las placas de Peyer a nivel del íleo distal, lugar por el cual *S. typhi* atraviesa la barrera epitelial humana, produciendo una enfermedad sistémica. El fenotipo invasor de la bacteria es expresado cuando la bacteria se pone en contacto con la célula epitelial, y estaría inducido por las condiciones ambientales que prevalecen durante ese contacto. Se ha visto que para otros enteropatógenos como *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium* las condiciones de crecimiento bacteriano, como la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y la

osmolaridad del medio, modifican la capacidad de invadir cultivos celulares (Maurelli y col., 1984; Maurelli y Sansonetti, 1988; Schiemann y Shope, 1991).

Para determinar qué condiciones ambientales afectan el fenotipo invasor de *S. typhi* silvestre *in vitro*, se estudió el comportamiento de la bacteria silvestre frente a células HEp-2, creciendo la bacteria en distintas condiciones, previo al ensayo de invasión. El ensayo utilizado consiste en incubar las bacterias con una monocapa de células epiteliales para permitir la internalización de la bacteria, eliminar aquéllas que no invadieron el cultivo por incubación con un antibiótico que no penetra al interior de la célula (gentamicina), y luego romper la monocapa para recuperar y contar las bacterias viables intracelulares. Se usó en este estudio la línea HEp-2, que corresponde a células epiteliales de origen humano.

Se evaluó en primer lugar si el crecimiento de la bacteria en medio rico o en medio mínimo influía en el fenotipo invasor de *S. typhi*, manteniendo ambos cultivos a 37° y en condiciones aeróbicas. Analizando un ensayo representativo (Tabla 7), se observó que cuando las bacterias fueron crecidas en LB (medio rico), el 0,42% de las bacterias invadieron el cultivo celular. Esta capacidad fue drásticamente reducida cuando la bacteria fue crecida en un medio mínimo, ya que sólo el 0,0013% de las bacterias inoculadas pudieron invadir la monocapa de células HEp-2. Cuando se comparó el fenotipo invasor de *S. typhi* silvestre al crecer la bacteria en los mismos medios, esta vez en condiciones anaeróbicas, se observó que, crecida en medio rico *S. typhi* invadió un 3,98% respecto al inóculo inicial y cuando se creció en un medio

TABLA 7. Efecto de las condiciones de crecimiento y medio de cultivo en el fenotipo invasor de *S. typhi* Ty2*

Medio de crecimiento	Aerobiosis	Anaerobiosis	Anaer/Aer
Caldo Luria (LB)	0,42	2,98	7,1
Medio mínimo E [#]	0,0013	0,0081	6,3

*: El resultado se expresa como % de bacterias que fueron internalizadas por la monocapa de células epiteliales HEp-2 respecto al inóculo agregado en el ensayo. Las bacterias fueron crecidas a 37°C, y se usó una multiplicidad de infección de 10 bacterias por célula HEp-2. En la tabla se presentan valores de un ensayo representativo. Cada experimento fue repetido al menos tres veces.

#: el medio mínimo fue suplementado con cisteína y triptofano.

mínimo sólo lo hizo en un 0,008% (Tabla 7). Se registró en ambos casos un aumento de alrededor de 300 veces en la capacidad de *S. typhi* de invadir células HEp-2 cuando la bacteria fue crecida en un medio rico como LB. Este resultado señala la importancia de la composición del medio de crecimiento bacteriano en la expresión de los factores necesarios para llevar a cabo este evento.

Una de las condiciones que encuentra la bacteria en el intestino durante el contacto con la barrera epitelial, es la baja disponibilidad de oxígeno. Este factor aumenta la capacidad de invadir de *S. typhimurium* (Schiemann y Shope, 1991) respecto a la bacteria crecida en ambiente aeróbico. Por lo tanto, se determinó el efecto de esta variable en el comportamiento de *S. typhi* midiendo la eficiencia de invasión al crecer la bacteria en aerobiosis y anaerobiosis. Se pudo detectar que para esta bacteria hay un aumento de 7-10 veces en la capacidad de invadir células HEp-2 cuando es crecida en condiciones anaeróbicas. Este resultado fue observado al crecer las bacterias tanto en medio mínimo como en medio rico (Tabla 7).

Los enteropatógenos están presentes en aguas contaminadas, donde el ambiente generalmente presenta temperatura y osmolaridad menor que aquéllas que la bacteria encuentra en el hospedero. Se ha demostrado que cambios en estos parámetros también influyen sobre la capacidad de la bacteria de invadir células en cultivo. Para determinar el efecto de la osmolaridad en la capacidad de invadir las células epiteliales, se creció la bacteria en medio LB preparado con distintas concentraciones de NaCl. Se observó que al variar la osmolaridad del medio, la capacidad de *S. typhi* de penetrar a células epiteliales fue modificada desde un 1% registrado a la osmolaridad más baja hasta un

13%, obtenido al crecer la bacteria en LB preparado con 10 g/l de NaCl. Concentraciones de NaCl mayores disminuyeron la capacidad de *S. typhi* de invadir (Figura 2). Este resultado sugiere que existe un rango de osmolaridad en el cual el fenotipo invasor es favorecido, y este rango que frecuentemente fue entre 5 y 10 g/l de NaCl, estaría relacionado con la osmolaridad que la bacteria encuentra en el interior del hospedero.

La temperatura de crecimiento de la bacteria también es una señal del medio ambiente que modifica la capacidad de invadir células epiteliales, como se ha demostrado para bacterias del género *Shigella* y *Yersinia* (Maurelli y col., 1984). Sin embargo, para *S. typhi* la variación de temperatura de crecimiento de la bacteria entre 30° y 37° no alteró la invasividad a células HEP-2.

De esta caracterización del fenotipo invasor de *S. typhi* se determinó como condiciones de crecimiento bacteriano estándares, previo al ensayo de invasión: LB (que contiene 5 g/l de NaCl) a 37°C, en condiciones anaeróbicas. Estas condiciones en conjunto favorecerían la expresión de los factores necesarios para que la bacteria sea internalizada por la célula eucariótica no fagocítica.

2.2. Caracterización de mutantes de *S. typhi* defectuosas en invasión

Considerando que la disponibilidad de oxígeno modula la expresión del fenotipo invasor de *S. typhi*, se estudió si genes regulados por anaerobiosis en *S. typhi* están

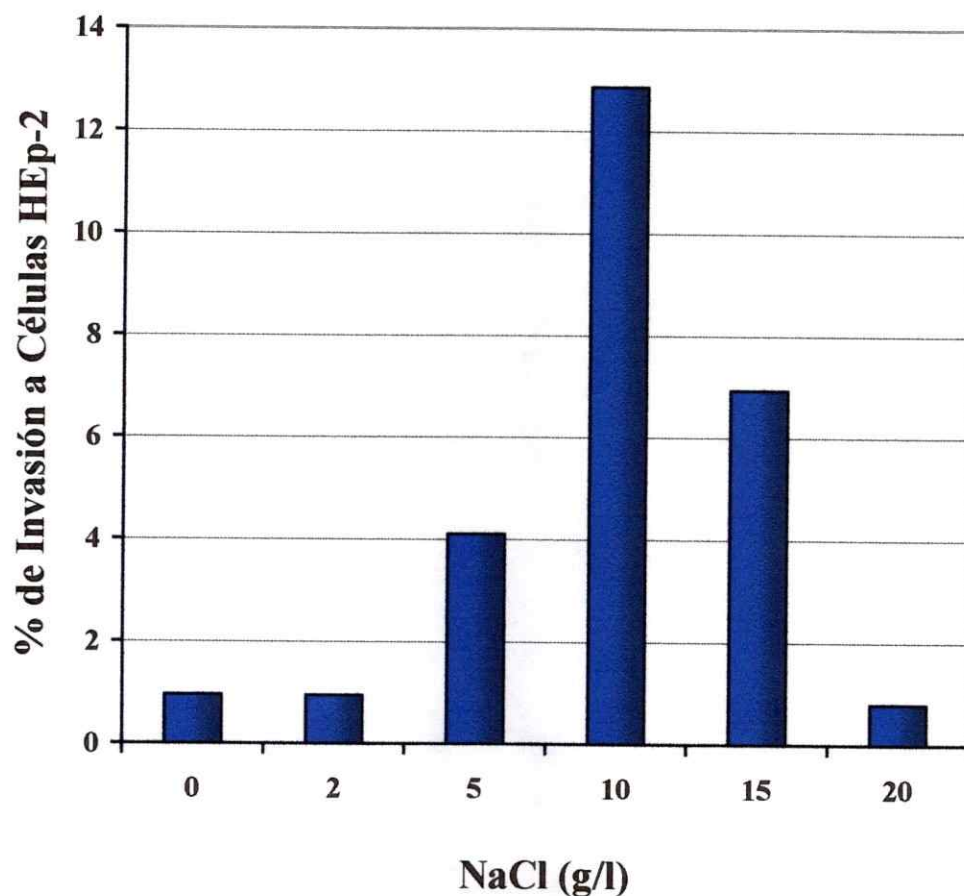


Figura 2. Efecto de la osmolaridad sobre el fenotipo invasor de *Salmonella typhi* silvestre en células epiteliales HEp-2. La cepa silvestre Ty2 fue crecida en LB preparado con distintas concentraciones de NaCl, para variar la osmolaridad del medio. Las bacterias fueron crecidas a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se usó una multiplicidad de infección de 10 bacterias por célula HEp-2 en el ensayo de invasión. Los resultados se expresan como % de bacterias internalizadas respecto al inóculo inicial. Se grafica un ensayo representativo.

involucrados en la capacidad de la bacteria de penetrar a células eucarióticas. Para ello, se generó una colección de aproximadamente 12.000 mutantes por inserción del fago transposón MudJ en el cromosoma de *S. typhi*. Se seleccionaron los clones cuyo gen mutado fue regulado por la disponibilidad de oxígeno del medio. Esta regulación se evidenció por una marcada diferencia de la expresión del gen reportero presente en MudJ (β -galactosidasa) al crecer la bacteria en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. De un total de 365 mutantes reguladas por la disponibilidad de oxígeno, 26 fueron inducidas en anaerobiosis. Mediante ensayos de invasión a células HEp-2 *in vitro*, se determinó que 10 de las 26 mutantes previamente seleccionadas presentaron defectos en la capacidad de invadir células epiteliales (Contreras, 1994). A partir de este trabajo previo, se pudo caracterizar fenotípicamente algunas de las mutantes, lo cual permitió sugerir la participación de genes involucrados en el metabolismo del nitrato en la capacidad de *S. typhi* de invadir células epiteliales (Contreras y col., 1997).

El trabajo desarrollado en esta tesis tuvo como objetivo caracterizar genéticamente algunas de estas 10 mutantes, para tratar de identificar el gen, que inducido en anaerobiosis, participa también en el fenotipo invasor de *S. typhi*. Para ello, fue necesario, en primer lugar, elaborar un método que permitiera transferir la mutación a una cepa silvestre y determinar si el fenotipo detectado en la mutante original se repite en la cepa resultante (backcross).

2.3. Caracterización de las mutantes defectuosas en invasión después del “backcross”

Se estudiaron las mutantes NN19, JJ3, DD46 y C17, que fueron seleccionadas por ser inducidas en anaerobiosis y presentar defectos en la invasión a células HEp-2. Se transfirió el marcador MudJ de cada una de ellas a *S. typhi* silvestre, mediante la estrategia desarrollada previamente, que consistió en transformar con DNA cromosomal de cada una de las mutantes a la cepa de *S. typhi* silvestre. Se transfirió además el marcador a *S. typhimurium*, transformando la cepa MA5383 (*recD mutS hsd*). Luego, por transducción desde esta última cepa se llevó el marcador MudJ a las cepas de *S. typhimurium* silvestre (LT2 y 14028).

2.3.1. Análisis mediante Southern blot

En primer lugar, se demostró la transferencia del marcador MudJ a estos nuevos contextos genéticos mediante Southern blot. Se compararon los patrones de hibridación de las mutantes originales y sus respectivas derivadas, usando dos sondas pertenecientes a la secuencia de MudJ (un fragmento HindIII/PstI y un fragmento HindIII/BamHI derivados del plasmidio pJP317). Las muestras de DNA cromosomal fueron digeridas con EcoRI, se separaron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa y se transfirió el gel a una membrana de Nylon. Esta membrana fue hibridada con el fragmento HindIII/PstI (Sonda 1), luego fue lavada según las indicaciones del fabricante, para hibridarla posteriormente con el fragmento HindIII/BamHI (Sonda 2). En la Figura 3 se muestra el resultado de la hibridación para la mutante C17 y la mutante NN19.

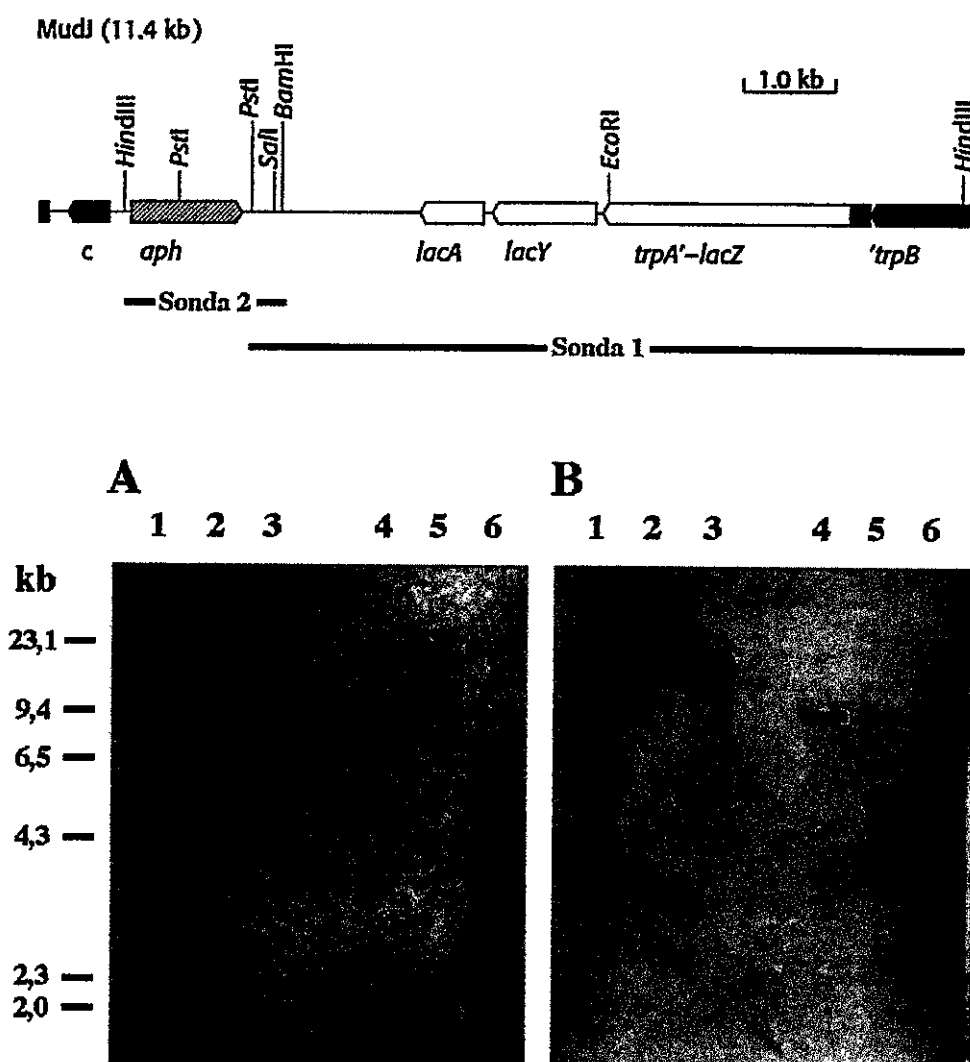


Figura 3. Análisis por hibridación Southern de las mutantes obtenidas por transferencia del marcador MudJ desde *S. typhi* a *S. typhi* y a *S. typhimurium*. Se muestra un esquema del transposón MudJ y su mapa de restricción. El fragmento HindIII del transposón fue clonado en el plasmidio pJP317, a partir del cual se obtuvo la sonda 1 (fragmento HindIII/PstI) y la sonda 2 (fragmento HindIII/BamHI). Ambas fueron marcadas usando nucleótidos biotinilados. Muestras de DNA cromosomal de cada cepa fueron digeridas con EcoRI y separadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel fue transferido a membrana de Nylon, prehibridado e hibridado en condiciones de alta estrictez, de acuerdo a las indicaciones de Photogene System Detection. En el panel A se muestra el patrón de hibridación obtenido con la sonda 1. En el panel B se muestra la hibridación obtenida con la sonda 2, usando la misma membrana previamente lavada. Las muestras de DNA provienen de las siguientes cepas: 1, *S. typhi* C17; 2, *S. typhi* TyT2161, obtenida por transferencia de la mutación C17 a *S. typhi* silvestre; 3, *S. typhimurium* MA5419, obtenida por transferencia de la mutación de la cepa C17 a *S. typhimurium* silvestre; 4, *S. typhi* NN19; 5, *S. typhi* TyT2163, obtenida por transferencia de la mutación NN19 a *S. typhi* silvestre; 6, *S. typhimurium* MA5432, obtenida por transferencia de la mutación de la cepa NN19 a *S. typhimurium* silvestre.

Como se muestra en el esquema de la figura 3, MudJ presenta 1 sitio de corte con la enzima EcoRI. Se espera que la Sonda 1 hibride con dos fragmentos cuando se digiere el DNA de una mutante MudJ con EcoRI. Se observó que el perfil de hibridación de la cepa C17 mostró más de dos bandas (Fig. 3, panel A, carril 1). La cepa NN19, en cambio, presentó dos bandas, como se esperaba para mutantes con inserción única de MudJ (Fig. 3, panel A, carril 4). Las cepas derivadas de la mutante C17, tanto en *S. typhi* como en *S. typhimurium* (Fig. 3, panel A, carriles 2 y 3), mostraron el mismo patrón de hibridación, que consistió en un duplete. Las cepas derivadas de la mutante NN19 (Fig. 3, panel A, carriles 5 y 6) presentaron dos bandas, similares en tamaño a las observadas para la mutante original.

La Sonda 2 hibrida sólo con un fragmento de MudJ digerido con EcoRI, que corresponde al segmento que contiene el gen de resistencia a Kan (*aph*). La hibridación de la cepa C17 (Fig. 3, panel B, carril 1) dio, sin embargo, dos bandas reconocidas por esta sonda. Las cepas derivadas de C17, en cambio, presentaron una banda de hibridación, cuyo tamaño coincidió con una de las bandas presentes en la cepa C17 (Fig. 3, panel B, carriles 2 y 3). Los carriles 4, 5 y 6 del panel B, correspondientes a las mutantes derivadas de la cepa NN19, presentaron una banda del mismo tamaño. Este resultado sugiere fuertemente que la cepa C17 presenta dos inserciones MudJ, de las cuales sólo una de ellas fue transferida por transformación a *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres. La cepa NN19 presentaría sólo una inserción de MudJ, que después de ser transferida a cepas silvestres presentó el mismo patrón de hibridación, indicando que la transferencia del marcador cromosomal se llevó a cabo en la región homóloga.

2.3.2. Análisis del fenotipo de las mutantes

La etapa siguiente en la caracterización de las mutantes después del “backcross”, fue demostrar que la inserción MudJ transferida a las cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestre confería el mismo fenotipo registrado para las mutantes originales.

Las mutantes NN19, DD46, y JJ3, además de presentar el gen mutado inducido en anaerobiosis y presentar defectos en la invasión a células HEP-2, presentaron un fenotipo resistente a clorato, que estaría determinado por defectos en el metabolismo anaeróbico del nitrato (Contreras y col., 1997). El fenotipo resistente a clorato se asocia a la falta de actividad de la enzima nitrato reductasa, que en anaerobiosis es capaz de reducir el clorato a clorito, compuesto altamente tóxico para la bacteria. Las mutantes NN19, DD46, y JJ3 no fueron capaces de crecer en anaerobiosis en un medio mínimo, usando nitrato como único aceptor de electrones. Sin embargo, la cepa NN19 creció en este medio cuando fue suplementado con molibdato, que es cofactor imprescindible para la actividad de la nitrato reductasa. Se descartó entonces que la mutación en esta cepa estuviera en el gen estructural de la enzima nitrato reductasa, *nar*. Esto sugiere además que el problema de la mutante tiene relación con la captación de molibdato, que puede ser obviado cuando existe exceso en el medio de cultivo. Para las otras mutantes, la adición de molibdato no tuvo efecto (Contreras y col., 1997).

Dado el fenotipo de las mutantes originales, se evaluó el comportamiento de las nuevas mutantes frente a las células epiteliales *in vitro*; se determinó la actividad β -galactosidasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas; y por último se determinó la sensibilidad a clorato, analizando uno o dos clones para cada mutante (Tabla 8). Se

TABLA 8. Caracterización de mutantes de *S. typhi*::MudJ y sus derivadas en *S. typhimurium*

Cepas ^a	Invasión a células HEp-2 ^b	Fenotipo asociado ^c
<i>S. typhi</i> NN19	12	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
<i>S. typhimurium</i> MA5432	8	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
<i>S. typhi</i> DD46	45	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
<i>S. typhimurium</i> MA5438-1	59	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
<i>S. typhimurium</i> MA5438-2	47	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
<i>S. typhi</i> C17	3	inducida en anaerobiosis
<i>S. typhimurium</i> MA5442-1	18	inducida en anaerobiosis
<i>S. typhimurium</i> MA5442-2	20	inducida en anaerobiosis

a: Cada grupo de cepas corresponde a la mutante de *S. typhi* parental y clones de *S. typhimurium*, obtenidos después de la transferencia de la inserción MudJ desde la cepa parental a la cepa *S. typhimurium* 14028. La denominación 1 y 2 distingue clones independientes.

b: El resultado se expresa como % de invasión respecto a la cepa isogénica silvestre. Para *S. typhimurium* es la cepa virulenta 14028 y para *S. typhi* es la cepa Ty2. En la tabla se presentan valores de un ensayo representativo. Cada experimento fue repetido al menos tres veces.

c: Todas las cepas presentaron fenotipo Lac⁺, Kan^r.

evaluó el efecto de la mutación en el fenotipo invasor en *S. typhimurium* usando la cepa derivada de la cepa virulenta 14028.

La inserción MudJ en la cepa de *S. typhimurium* MA5432, derivada de la cepa NN19, tuvo un efecto importante sobre el fenotipo invasor en células HEp-2 al disminuir su capacidad a un 8% respecto a la cepa silvestre (Tabla 8). Un efecto similar al descrito se obtuvo para la cepa NN19. Las cepas de *S. typhimurium* MA5438 y MA5442, derivadas de las cepas DD46 y C17 respectivamente, también disminuyeron su fenotipo invasor en proporción similar a las cepas isogénicas. De igual forma, se determinó que todas las mutantes estudiadas presentaron actividad β -galactosidasa inducida en anaerobiosis y que para el caso de las cepas NN19, DD46 y JJ3, la inserción MudJ transferida a *S. typhimurium* además confirió el fenotipo de resistencia a clorato, como lo observado para la cepa original.

Un resultado similar se obtuvo al caracterizar las mutantes de *S. typhi* TyT2161, TyT2163, TyT2164 y TyT2165, obtenidas por la transferencia del marcador MudJ de las cepas C17, NN19, JJ3, y DD46 respectivamente, a la cepa silvestre Ty2 (Tabla 9). La actividad β -galactosidasa fue inducida en anaerobiosis para todos los clones ensayados y la capacidad de invadir cultivos celulares disminuyó respecto a la cepa silvestre. Se confirmó además el fenotipo de resistencia a clorato para las cepas derivadas de NN19 y DD46.

TABLA 9. Caracterización de mutantes de *S. typhi*::MudJ y sus derivadas en *S. typhi*

Cepas de <i>S. typhi</i> ^a	Invasión a células HEp-2 ^b	Fenotipo asociado ^c
NN19	39	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
TyT 2163	54	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
JJ3	10	inducida en anaerobiosis
TyT 2164-1	5	inducida en anaerobiosis
TyT 2164-2	8	inducida en anaerobiosis
DD46	9	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
TyT 2165-1	37	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
TyT 2165-2	32	Clorato ^r ; inducida en anaerobiosis
C17	28	inducida en anaerobiosis
TyT 2161	58	inducida en anaerobiosis

a: Cada grupo de cepas corresponde a la mutante de *S. typhi* parental y clones de *S. typhi* obtenidos después de la transferencia del marcador MudJ desde la cepa parental a la cepa de *S. typhi* Ty2 silvestre. La denominación 1 y 2 distingue clones independientes.

b: El resultado se expresa como % de invasión respecto a la cepa de *S. typhi* Ty2. En la tabla se presentan valores de un ensayo representativo. Cada experimento fue repetido al menos tres veces.

c: Todas las cepas presentaron fenotipo Lac⁺, Kan^r.

2.4. Localización cromosomal de la mutación en cepas de *S. typhi* defectuosas en invasión a células epiteliales

La inserción MudJ de las mutantes de *S. typhi* fue mapeada usando las cepas derivadas de *S. typhimurium*, básicamente como se describió para las cepas auxotróficas (Materiales y Métodos). De esta forma, se pudo situar la mutación de la cepa NN19 en la región del minuto 16 al minuto 19 en el mapa de *S. typhimurium* (Tabla 5). Considerando el fenotipo resistente a clorato y el efecto de molibdato en el fenotipo de esta cepa, se pudo sugerir que el gen mutado es el gen homólogo a *modC*, cuyo producto génico participa en la movilización de Molibdato y mapea en el minuto 18,3 del cromosoma de *S. typhimurium*. Mutantes en este gen no presentan actividad nitrato reductasa, lo que conferiría el fenotipo resistente a clorato.

Análogamente, se localizó la inserción MudJ de la cepa JJ3 entre los minutos 17 y 19 del mapa de *S. typhimurium* (Tabla 5). Sabiendo que la mutante JJ3 no es capaz de crecer en un medio mínimo con nitrato como único aceptor de electrones, aún cuando se agrega Molibdato al medio, se sugiere que el gen homólogo a *moaA* (minuto 19) es el gen interrumpido por la inserción de MudJ. Este gen también está relacionado al metabolismo del molibdato y a la actividad nitrato reductasa.

La mutación de la cepa DD46 fue mapeada en la región que comprende los minutos 67 al 69 de *S. typhimurium*, región en la cual se han descrito algunos genes inducidos en anaerobiosis como *oxdA*, *aniG* y *aniF* (Sanderson y col., 1995), sin embargo, mutantes en estos genes no han sido caracterizados en relación al fenotipo

invasor *in vitro*, ni al efecto que puedan tener en la virulencia de la bacteria, por lo que no se puede sugerir la identidad del gen mutado en base a esta información.

Para el caso de la mutante C17, la mutación se ubicó entre el minuto 91 y el minuto 93 (Tabla 5). En esta región también se han descrito varios genes regulados por anaerobiosis (*aniD*, *oxdB*, *fdhF*), que hasta la fecha no han sido relacionados con el proceso de invasión a células epiteliales, ni con la virulencia de *Salmonella*.

Las mutantes DD46 y C17 fueron posteriormente secuenciadas, y de acuerdo a esos resultados se puede sugerir la identidad de los genes mutados por la inserción MudJ. La cepa C17 tendría la inserción en el gen homólogo a *fdhF*, que codifica para la enzima formiato deshidrogenasa FdhH. Este gen fue localizado en el minuto 92,8 en el cromosoma de *S. typhimurium* y en el minuto 92,4 en el mapa de *E. coli*. La mutante DD46 probablemente tiene la mutación en el gen homólogo a *uxaC* descrito sólo para *E. coli*, que codifica para la enzima uronato isomerasa y que se localiza en el minuto 69,5 (Tabla 5).

3. Caracterización molecular de la mutación en la cepa C17

3.1. Clonamiento de la inserción MudJ de la cepa C17

Los métodos clásicos de clonamiento no han sido efectivos para clonar las mutaciones con inserción MudJ, debido probablemente a secuencias propias del fago

Mu pueden inducir reordenamientos internos y deleciones en el vector de manera que lo inestabilizan (Albertini y col., 1982; Bi y Liu, 1994).

Esta dificultad puede soslayarse mediante el clonamiento de un fragmento de la inserción MudJ fácilmente seleccionable, en vez del elemento completo. Se intentó por lo tanto, clonar el fragmento que contiene el gen de resistencia a Kan, presente en un extremo de MudJ, y la región de DNA cromosomal adyacente a la inserción.

Para ello se digirió el DNA cromosomal de la cepa C17 con la endonucleasa SalI. Luego se resolvió la digestión mediante electroforesis en gel preparativo de agarosa. Se cortó el trozo de agarosa que contenía los fragmentos entre 4 a 6 kb, los que fueron purificados y posteriormente ligados al vector pBluescript II KS (+). La mezcla de ligación fue usada para transformar la cepa de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron 6 clones que contenían plasmidio y eran resistentes a Kan y Amp. La digestión de estos plasmidios con la endonucleasa SalI liberó el fragmento clonado, que para los 6 clones fue de tamaño aproximado a 4kb. Un análisis de restricción con HindIII y PstI permitió identificar el mismo patrón de restricción para los 6 clones, lo que sugirió que todos presentaban el mismo inserto. Uno de los clones, denominado pCT17, fue esquematizado en la Figura 4: en colores, el inserto de DNA de 4kb proveniente de la cepa C17; en azul, el segmento de DNA que corresponde al extremo de MudJ que contiene el marcador de resistencia a Kan, limitado por los sitios de corte para las enzimas SalI y HindIII, y el extremo izquierdo de Mu; en rojo la región de DNA cromosomal adyacente a la inserción MudJ en la cepa C17, que posee un sitio de corte para la enzima PstI.

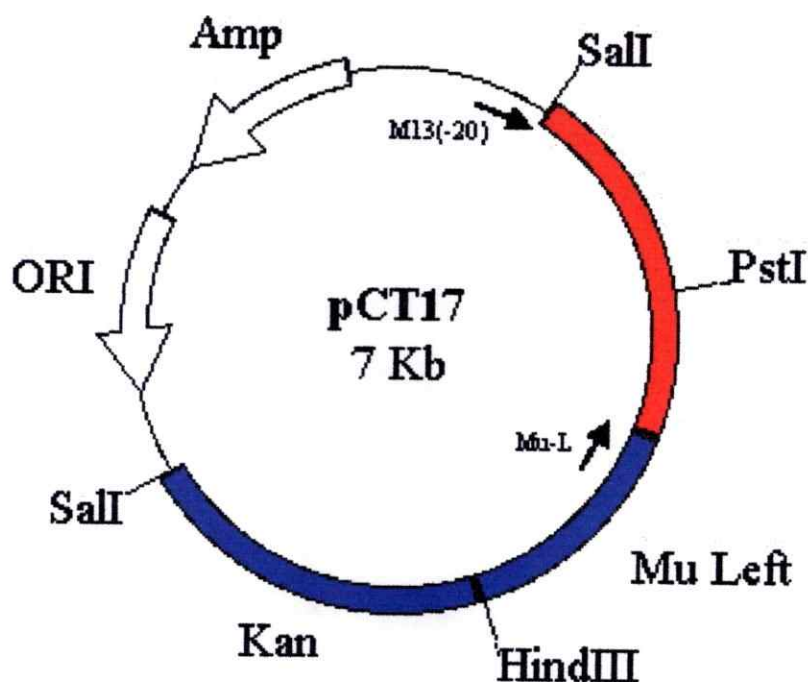


Figura 4. Esquema del plasmidio pCT17. Se clonó el marcador de resistencia a Kan proveniente de la cepa C17 en el sitio Sall del vector pBluescript II KS (+). El inserto de 4kb, presenta un sitio de corte para HindIII y uno para PstI como se indica en la figura. Se representa en color azul el segmento de MudJ que codifica para la resistencia a Kan y el extremo izquierdo de Mu. El fragmento rojo corresponde a la secuencia de DNA cromosomal de la cepa C17, adyacente a la inserción de MudJ de aproximadamente 1,5 kb. Se muestran los oligonucleótidos M13-20 y Mu-L, que fueron usados como partidores para las reacciones de secuenciación del inserto.

3.2. Secuenciación del gen interrumpido por la inserción MudJ en la mutante C17

3.2.1. Secuenciación a partir del plasmidio pCT17

Se usaron dos métodos para secuenciar parcialmente el inserto clonado en el plasmidio pCT17. El fragmento de DNA cromosomal inmediatamente adyacente a la inserción MudJ fue secuenciado usando un partidador complementario a la secuencia de DNA del extremo de Mu (Mu-L), según las indicaciones del kit *fmol* de PROMEGA. De esta forma se logró obtener la secuencia nucleotídica de un fragmento continuo de 400 pb, denominado C17-400pb. Para secuenciar el extremo opuesto del fragmento clonado en pCT17, se usó el kit SEQUENÁSE y un partidador universal complementario con la secuencia adyacente al sitio de clonamiento del vector (M13 -20) (Fig. 4). Se obtuvo así la secuencia nucleotídica de un fragmento de 250 pb, denominada C17-250pb.

Ambas secuencias fueron comparadas con otras presentes en bancos de datos mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1997). El análisis de estas secuencias indicó que ambas presentaron homología con el gen *fdhF* de *E. coli*, que codifica para la enzima formiato deshidrogenasa, FdhH (Zinoni y col., 1986).

Usando el método de Clustal (Higgins y Sharp, 1989), se estableció que la secuencia de nucleótidos del fragmento C17-400pb presentó un 91% de similitud con la secuencia del gen *fdhF*. Se detectaron 378 nucleótidos idénticos de los 412 comparados, considerando sólo dos "gaps" (Figura 5). La secuencia de 130 aminoácidos deducida a partir de este fragmento mostró un 97% de similitud con el producto génico de *fdhF*, al hacer un alineamiento de estas secuencias mediante el programa BLAST (Altschul y

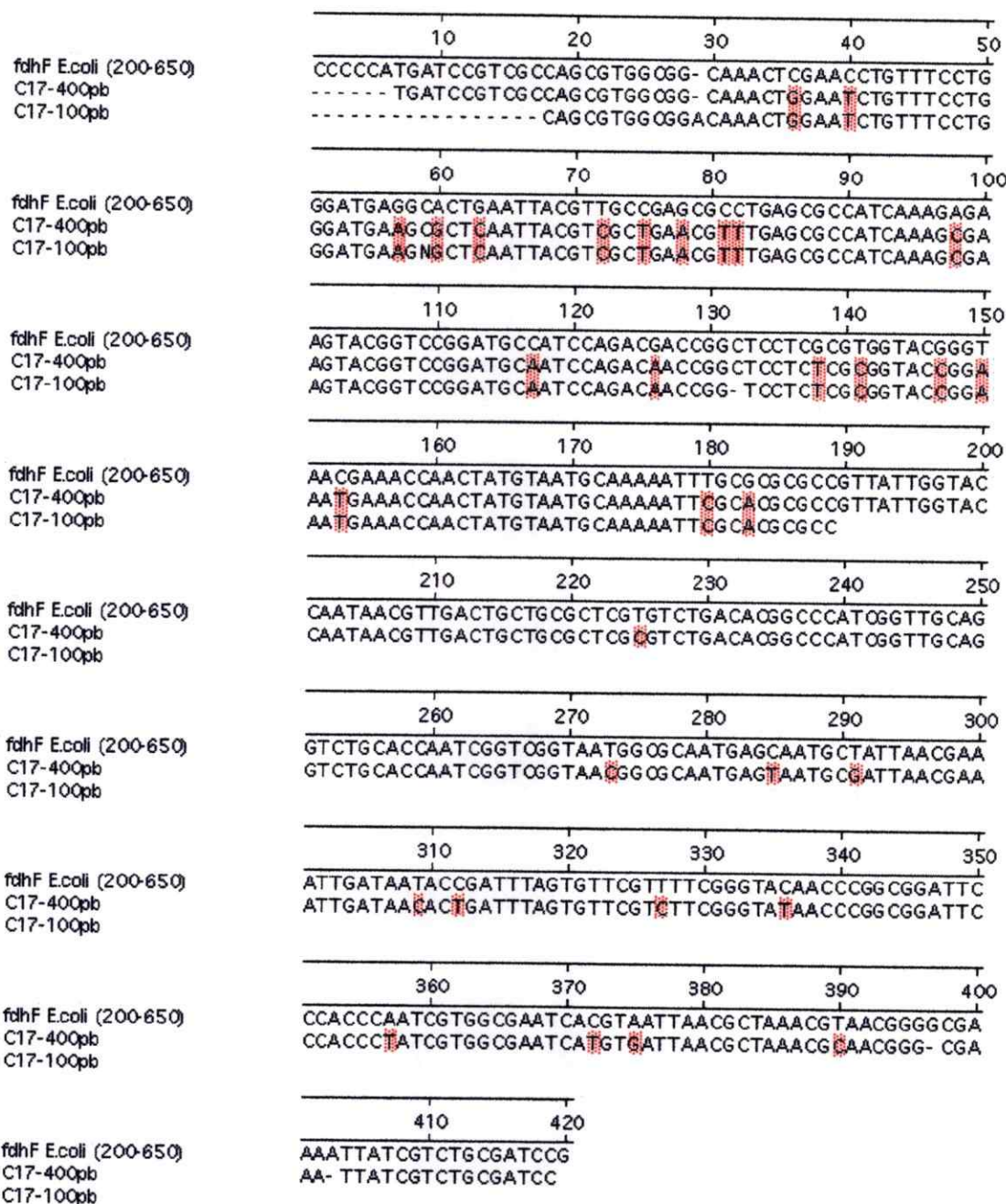


Figura 5. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *fdhF* de *E. coli* y del gen mutado por la inserción MudJ en la cepa C17. Usando el método de Clustal (Higgins y Sharp, 1989), se comparó el fragmento del gen *fdhF* de *E. coli* desde el residuo 200 al 650, con la secuencia C17-400pb obtenida desde el plasmidio pCT17, y la secuencia C17-100pb obtenida desde el lisado MudP de la cepa *S. typhimurium* MA5419/MudP. Los residuos que difieren de la secuencia del gen de *E. coli* fueron achurados con rojo.

col., 1990) (Figura 6). Una característica relevante del gen *fdhF* es el codón TGA en la posición 417 del gen, que corresponde normalmente a un codón de término de la traducción pero en este caso codifica para el aminoácido selenocisteína, presente en muy pocas proteínas. Este residuo es imprescindible para la actividad del producto génico de *fdhF*: FdhH (Zinoni y col., 1986). Se destaca la conservación de este codón correspondiente a la selenocisteína, ubicada en la posición 140 de la proteína de *E. coli* (Figura 6). El aminoácido selenocisteína no es reconocido como tal en este programa, pero está presente en ambas secuencias en la misma región, así es que se reemplazó por una letra X marcada en rojo, en la posición 140 de la proteína de *E. coli* (Figura 6).

La comparación de la secuencia nucleotídica del fragmento C17-250pb presentó menor similitud que el fragmento anterior: 90% al comparar un fragmento de 125pb y 70% al comparar el fragmento completo de 250pb, sugiriendo que existe mayor variabilidad dentro de la proteína en el extremo C-terminal. De hecho, la secuencia del péptido de 80 aminoácidos, deducido a partir del fragmento C17-250pb, presentó sólo un 50% de similitud con la secuencia correspondiente a la proteína FdhH (Figura 7).

La Figura 8 representa la secuencia completa del gen estructural de *fdhF* de *E. coli* tomada de un banco de datos con el N° de acceso: M13563, gb. En este esquema se muestra la posición de las secuencias C17-400pb y C17-250pb relativas al gen de *E. coli* en color rojo. Se indica además el posible corte Sall reconocido en *S. typhi*, que no está presente en *E. coli*. El análisis de la secuencia del gen *fdhF* de *E. coli* indicó que este gen tampoco presenta un sitio de reconocimiento para la enzima PstI, a diferencia de lo observado en el fragmento de DNA clonado en el plasmidio pCT17 (Figura 4).

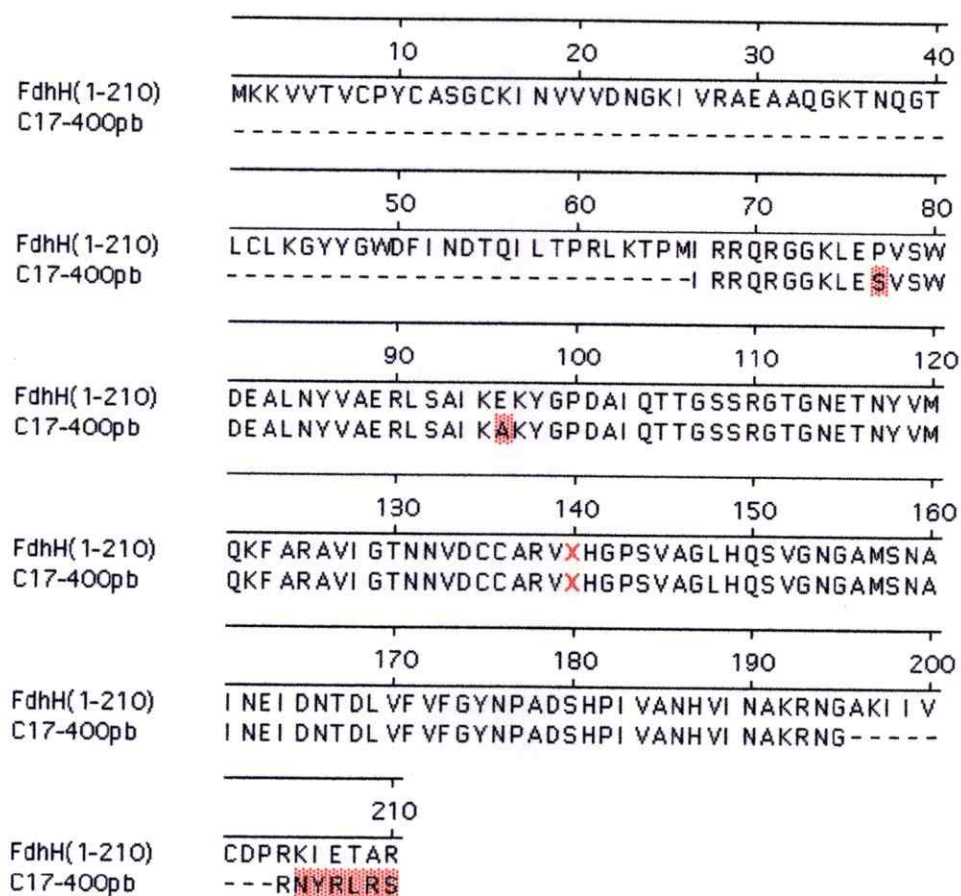


Figura 6. Alineamiento de la secuencia de la proteína FdhH de *E. coli* y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del fragmento C17-400pb. Se compara el fragmento correspondiente a los primeros 200 aminoácidos de la proteína de *E. coli* y el péptido deducido del fragmento C17-400pb completo, usando el método de Clustal (Higgins y Sharp, 1989). Los residuos que difieren fueron achurados con rojo. El aminoácido selenocisteína se indica con una X de color rojo en la posición 140 de la proteína de *E. coli*.

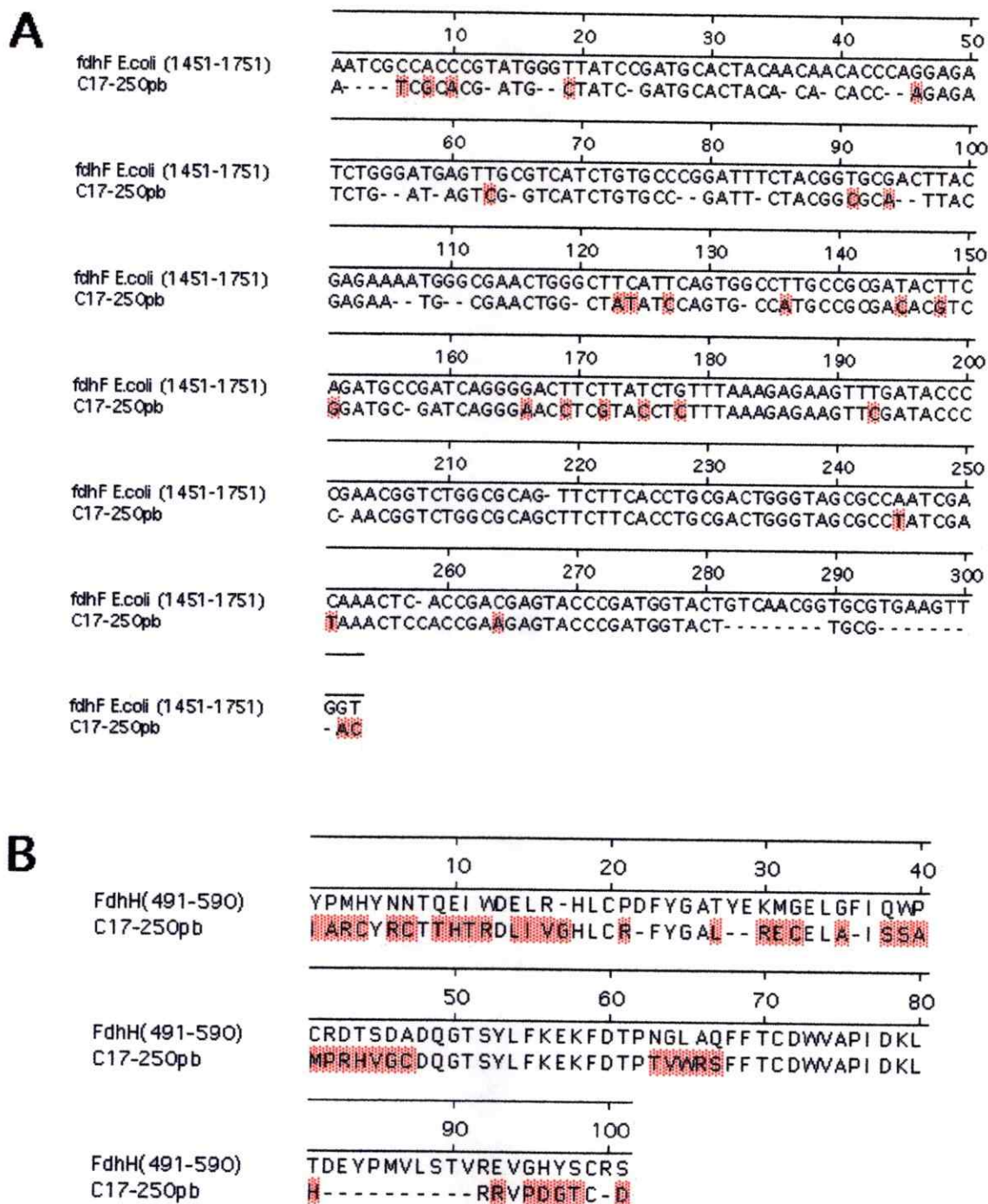


Figura 7. Alineamiento de las secuencias del gen *fdhF* y la proteína FdhH de *E. coli* con el fragmento C17-250pb. En A, se compara la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen *fdhF* de *E. coli* (residuos 1451 al 1751) con la secuencia C17-250pb obtenida desde el plasmidio pCT17. En B, se compara el fragmento correspondiente a los aminoácidos 491 al 590 de la proteína FdhH de *E. coli* y el péptido deducido del fragmento C17-250pb. Para todas las comparaciones se utilizó el método de Clustal (Higgins y Sharp, 1989). Los residuos que difieren de las secuencias de *E. coli* fueron achurados con rojo

```

701.  tgtagtcgag agcgcgtatg cgtgatttga ttaactggag cgagaccgat
751.  gaaaaaagtc gtcacggttt gccctattg cgcacaggt tgcaaatca
801.  acgtggtcgt cgataacggc aaaatcgtcc gggcggaggc agcgcagggg
851.  aaaaccaacc aggtaccct gtgtctgaag ggttattatg gctgggactt
901.  cattaacgat acccagatcc tgaccccgcg cctgaaaac cccatgatcc
951.  gtcgccagcg tggcggcaaa ctgaaacctg ttcctggga tgaggcactg
1001. aattacgttg ccgagcgct gagcgccatc aaagagaagt acggtccgga
1051. tgccatccag acgaccggt cctcgcgtgg tacgggtaac gaaaccaact
1101. atgtaatgca aaaatttgcg cgcgccgta ttggtacca taacgttgac
1151. tgctgcgctc gtgtctgaca cggccatcg gttgcaggtc tgcaccaatc
1201. ggctcgtaat ggcgcaatga gcaatgctat taacgaaatt gataataccg
1251. atttagtgtt cgttttcggg tacaaccggc cggattccca cccaatcgtg
1301. gcgaatcacg taattaacgc taaacgtaac ggggcgaaaa ttatcgtctg
1351. cgatccg cgcgcaaatgaaa ccgcgcgcat tgctgacatg cacattgcac
1401. tgaaaaacgg ctcgaacatc gcgctgttga atgcgatggg ccatgtcatt
1451. attgaagaaa

2101. tgaaggcgtg tttactgcgg ctgaccgtgg cttccagcgt ttcttcaagg
2151. cggttgaacc gaaatgggat ctgaaaacgg actggcaaact catcagtga
2201. atcgccacc gtatgggta tccgatgcac tacaacaaca cccaggagat
2251. ctgggatgag ttgcgtcatc tgtgcccgga tttctacggt gcgacttacg
2301. agaaaatggg cgaactgggc ttcattcagt ggccttgccg cgatacttca
2351. gatgccgatc aggggacttc ttatctgttt aaagagaagt ttgatcccc
2401. gaacggtctg gcgcagttct tcacctgca ctgggtagcg ccaatcgaca
2451. aactcaccga cgagtaccgg atgggtactgt caacggtgcg tgaagttggt
2501. cactactctt gccgttcgat gaccggtaac tgtgcggcac tggcggcgct
2551. ggctgatgaa cctggctacg cacaaatcaa taccgaagac gccaaacgtc
2601. tgggtattga agatgaggca ttggtttggg tgcactcgcg taaaggcaaa
2651. attatcacc gtgcgcaggt cagcgatcgt ccgaacaaag gggcgattta
2701. catgacctac cagtgggtgga ttgggtgcctg taacgagctg gttaccgaaa
2751. acttaagccc gattacgaaa acgcccggagt acaatactg cgcggttcgc
2801. gtcgagccga tcgccgatca gcgcgccgcc gagcagtagc tgattgacga
2851. gtacaacaag ttgaaaactc gcctgcgcga agcggcactg gcgtaatacc
2901. gtcctttcta cagcctcctt tcggaggctg tttttttatc cattcgaact
2951. ctttatactg gttacttccc g

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica del gen *fdhF* de *E. coli*. La secuencia de 2971 pb registrada con el número de acceso M13563 (gb), contiene la secuencia del gen estructural de *fdhF* de *E. coli*. Se muestra un segmento de esta secuencia, donde se destaca en azul el codón de inicio y término de traducción en las posiciones 749 y 2894, respectivamente. En rojo se destacan las regiones de DNA que fueron secuenciadas a partir del plasmidio pCT17 de *S. typhi* y que presentaron similitud con la secuencia de *E. coli*. Éstas corresponden al fragmento C17-400pb (940 al 1356), y al fragmento C17-250pb (2231 al 2478). En negrita y subrayado se muestra la probable región de inserción de MudJ en el clon C17 de *S. typhi*. En negrita se muestra la probable secuencia reconocida por SalI en *S. typhi*, que permitió clonar el segmento de DNA de alrededor de 1,5kb desde la cepa C17. Se subrayó en rojo el codón TGA para selenocisteína, ubicado en la posición 1165.

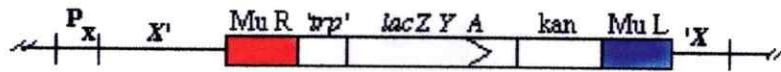
3.2.2. Secuenciación a partir del lisado de la cepa MA5419/MudP

Una segunda estrategia para secuenciar el gen mutado por la inserción MudJ, consistió en reemplazar el fago-transposón MudJ presente en una cepa de *S. typhimurium*, por el fago híbrido MudP22, que permite obtener un lisado enriquecido en los genes adyacentes a la inserción (Figura 9). La obtención de los derivados MudP y MudQ de una cepa presenta la ventaja que al inducir estos fagos, cada uno empaca DNA dentro de la partícula viral en dirección opuesta, de esta forma se logra amplificar en un caso (induciendo MudQ) el extremo 5' del gen mutado y en el otro caso (induciendo MudP) se enriquece el lisado en el lado 3' del gen (Figura 9). Los lisados obtenidos fueron concentrados y el DNA de las partículas fue extraído para ser usado como templado en la reacción de secuenciación. Todas las mutantes que fueron mapeadas requirieron el traspaso de la mutación MudJ al cromosoma de *S. typhimurium*, de manera que fue posible hacer este reemplazo de marca en las cepas previamente preparadas y obtener la cepa lisógena de MudP22, para luego secuenciar el gen mutado sin recurrir a la etapa de clonamiento.

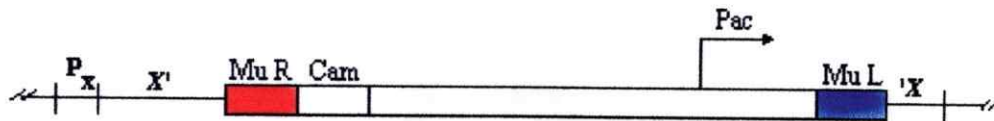
Se obtuvo el derivado MudP a partir de la cepa de *S. typhimurium* MA5419, que contiene la mutación MudJ presente en la cepa C17. Se extrajo DNA del lisado MudP y se secuenció el DNA adyacente a la inserción MudJ usando el kit *fmol* de PROMEGA y el partidador Mu-L, diseñado para la secuencia del extremo izquierdo de Mu. Se obtuvo así la secuencia nucleotídica de un fragmento de 100 pb, denominado C17-100pb.

C17-100pb, obtenido desde la cepa de *S. typhimurium* MA5419/MudP, presentó una gran similitud con la secuencia obtenida desde el clon pCT17 proveniente de *S.*

MudJ



MudP



MudQ

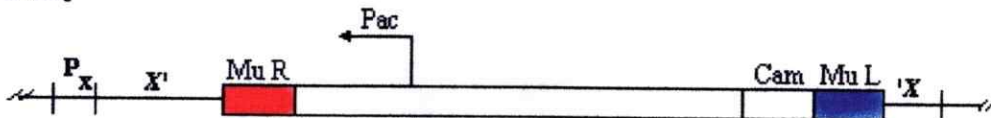


Figura 9. Derivados del fago Mu. En la figura se representan los elementos MudJ, MudP y MudQ. MudJ corresponde a un fago Mu defectivo que no posee las transposasas, contiene el gen *aph* (resistencia a kanamicina) y el operón *lac* sin promotor. MudP y MudQ corresponden a fagos híbridos que contienen los extremos derecho (rojo) e izquierdo (azul) del fago Mu, flanqueando un derivado del fago P22 cuyo marcador de selección es la resistencia a cloranfenicol. MudP y MudQ difieren en la orientación del derivado P22 con respecto a los extremos de Mu. El esquema muestra a los elementos MudJ, MudP y MudQ interrumpiendo la secuencia de un gen X. P_x corresponde al promotor de dicho gen.

typhi, y también mostró similitud con la secuencia del gen *fdhF* de *E. coli*. El alineamiento de estas tres secuencias, mediante el método de Clustal (Higgins y Sharp, 1989) confirmó que existe un 90% de secuencia idéntica a la secuencia de *E. coli* en el fragmento de 400 pb (Figura 8).

3.3. Caracterización del gen homólogo a *fdhF* de *E. coli* en *S. typhi*

Los resultados de secuenciación sugieren fuertemente que el gen mutado en la cepa C17 correspondería al homólogo de *fdhF* en *E. coli*. La presencia de este gen no ha sido descrita aún en *S. typhi*; por otra parte, el gen homólogo en *S. typhimurium* está mapeado, pero su secuencia no ha sido reportada aún.

Para confirmar que la mutación MudJ está presente en el gen homólogo a *fdhF* de *E. coli* en las cepas C17 y sus derivadas, se realizaron amplificaciones de las regiones cercanas a la inserción MudJ, usando partidores ubicados a ambos lados de la inserción.

Se preparó DNA cromosomal de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* silvestres, además de las cepas derivadas de la cepa C17. A partir de la región de mayor homología dentro del fragmento C17-400pb, se diseñaron los partidores 900-L y 900-R para amplificar un fragmento de 119 pb, de acuerdo a la secuencia del gen de *E. coli* (Figura 10). Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 120 pb, como único producto de amplificación, al usar DNA de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. typhi* silvestres (Fig.10, Panel A, carriles 1-3). Un fragmento de tamaño similar también fue obtenido al usar los DNA cromosomales de las cepas C17 (Fig.10, carril 4) y las cepas derivadas de C17: *S. typhi*

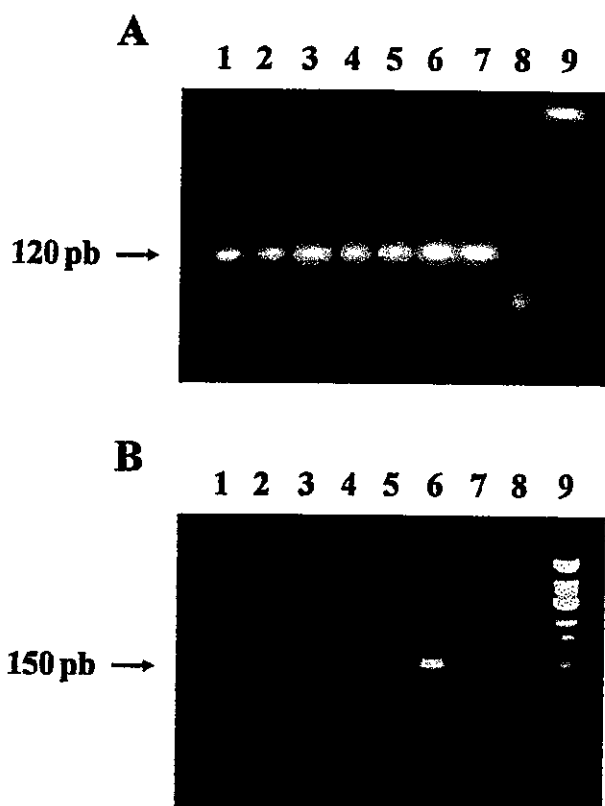
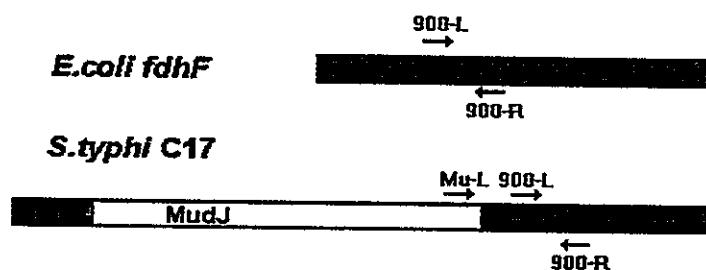


Figura 10. Amplificación por PCR del probable gen mutado en la cepa C17. A partir de la secuencia del gen *fdhF* de *E. coli*, que presentó similitud con el gen mutado de la cepa C17, se diseñaron los partidores 900-R y 900-L como se muestra en el esquema. Estos fueron usados en la reacción de amplificación mostrada en el panel A, para la cual se esperaba un producto de amplificación de 119 pb. En el panel B se observa la reacción de amplificación usando los partidores Mu-L (derivado de la secuencia del extremo izquierdo de Mu) y 900-R. El tamaño del producto de amplificación fue de alrededor de 150 pb. Cada carril muestra el producto de amplificación usando el DNA cromosomal correspondiente a: 1, *E. coli* silvestre.; 2, *S. typhimurium* silvestre; 3, *S. typhi* silvestre; 4, *S. typhi* C17; 5, *S. typhi* TyT2161; 6, *S. typhimurium* MA5419; 7, *S. typhimurium* MA5419/MudP; 8, control sin DNA; 9, estándar ϕ X174/ HinfII.

TyT2161 (Fig.10, carril 5), *S. typhimurium* MA5419 (Fig.10, carril 6) y *S. typhimurium* MA5419/MudP (Fig.10, carril 7).

Se hizo una reacción de amplificación con el partidor Mu-L, diseñado para el extremo izquierdo de Mu, y el partidor 900-R, para verificar si la inserción MudJ estaba contigua al fragmento de DNA secuenciado (Figura 10, Panel B). Al hacer esta modificación, las muestras de DNA de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. typhi* silvestres no presentaron producto de amplificación (Figura 10, Panel B, carriles 1-3), resultado esperado puesto que estas cepas no poseen inserción MudJ. Por el contrario, se detectó un producto de alrededor de 150 pb, cuando el DNA de todas las mutantes derivadas de C17 fue ensayado (Figura 10, carriles 4 al 7). Usando como control DNA de la cepa NN19, que presenta una inserción MudJ en otra posición, no se detectó amplificación, señalando la especificidad del producto para el probable gen *fdhF* en la cepa C17.

Se hizo un estudio similar considerando secuencias río arriba de la inserción MudJ. Para ello, se diseñó un tercer partidor, *fdh*-11, a partir de la secuencia 5' del gen *fdhF* de *E. coli*. Este partidor permite amplificar un fragmento de 300 pb en combinación con el partidor 900-R en el gen silvestre de *E. coli*. Se llevó a cabo esta amplificación y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 300 pb con los DNA de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. typhi* silvestres (Figura 11, Panel A, carriles 2-4). No hubo productos de amplificación cuando se usó DNA de las cepas derivadas de la cepa C17, sugiriendo que la inserción de MudJ separa los partidores a una distancia que no permite obtener un producto de amplificación (Figura 11, Panel A, carriles 5-8). Se probó posteriormente el partidor *fdh*-11 en combinación con el partidor Mu-R, que fue

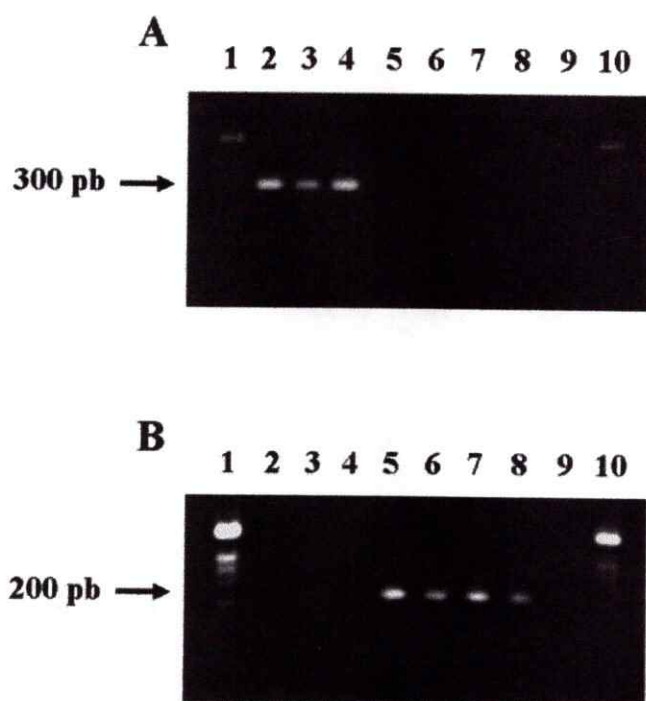
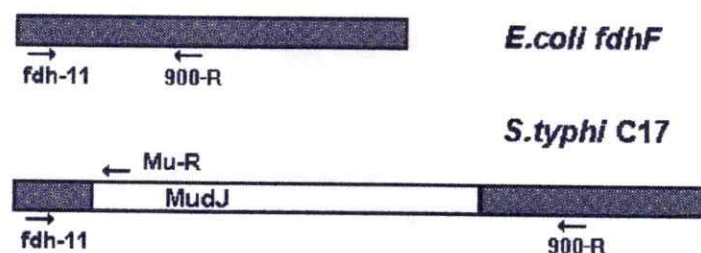


Figura 11. Amplificación por PCR del probable gen mutado en la cepa C17. Usando partidores correspondientes al extremo 5' del gen *fdhF* de *E. coli*, se diseñó el partidor *fdh-11*. Este partidor fue usado con el partidor 900-R para la reacción de amplificación mostrada en el Panel A, para la cual se obtuvo el producto esperado, de 300 pb. En el Panel B se observa la reacción de amplificación usando los partidores *fdh-11* y *Mu-R* (derivado de la secuencia del extremo derecho de *Mu*). El tamaño del producto de amplificación fue de alrededor de 200 pb. Cada carril muestra el producto de amplificación obtenido usando el DNA cromosomal correspondiente a: 1, estándar DNA ladder 1kb; 2, *E. coli* silvestre; 3, *S. typhimurium* silvestre; 4, *S. typhi* silvestre; 5, *S. typhi* C17; 6, *S. typhi* TyT2161; 7, *S. typhimurium* MA5419; 8, *S. typhimurium* MA5419/MudP; 9, control sin DNA; 10, estándar DNA ladder 1kb.

diseñado para el extremo derecho de MudJ. Al usar esta mezcla con los DNA de las cepas silvestres, no hubo amplificación (Figura 11, Panel B, carriles 2-4), sin embargo, con los DNA de las cepas derivadas de la cepa C17 se obtuvo un fragmento de alrededor de 200 pb (Panel b, carriles 5-8).

Estos resultados indicarían que existe un gen homólogo a *fdhF* de *E. coli* en *S. typhi* y en *S. typhimurium*. Además, indicarían que MudJ estaría inserto en el gen homólogo en *S. typhi*, ya que es posible amplificar fragmentos adyacentes a la inserción con los partidores propios de Mu. Por el tamaño del fragmento obtenido con el par de partidores *fdh-11/Mu-R*, se podría situar la inserción MudJ en la región 180-190 pb respecto al sitio de inicio de traducción del gen de *E. coli*. En la Figura 8 se indica en negrita y subrayado la posible ubicación de la inserción de MudJ en relación a la secuencia del gen de *E. coli*.

3.4. Regulación del probable gen *fdhF* de *S. typhi*

La proteína OxrA (denominada Fnr en *E. coli*), es uno de los reguladores transcripcionales globales que modula la expresión génica durante la anaerobiosis, activando algunos genes y reprimiendo otros, de manera de adaptar el metabolismo bacteriano a esta nueva condición ambiental (Spiro y Guest, 1991). Para determinar si la expresión de los genes mutados en las cepas NN19, DD46, JJ3, y C17 era dependiente de la presencia de OxrA, se estudió el efecto de la mutación *oxrA* en la regulación de estas mutantes. Se introdujo por transducción, la mutación *oxrA2::Tn10* desde la cepa MST2970 a las mutantes de *S. typhi* y se midió la expresión de la actividad β -

galactosidasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Tabla 10). Se observó que la mutante NN19 aumentó la expresión de la actividad β -galactosidasa al doble cuando es crecida en anaerobiosis (de 1.200 a 2.500 Unidades Miller); la cepa NN19 que contiene la mutación *oxrA* bajó los niveles de actividad enzimática a la mitad aproximadamente, pero se mantuvo el aumento de actividad en condiciones anaeróbicas. Un efecto similar se detectó para la cepa JJ3, ya que al introducir la mutación *oxrA::Tn10*, bajó los niveles de actividad enzimática pero mantuvo una inducción de alrededor de 3-4 veces cuando se creció en anaerobiosis. Las cepas DD46 y C17, presentaron un comportamiento distinto, puesto que la inducción de la expresión génica registrada en anaerobiosis fue menor en las cepas que presentaron la mutación *oxrA*, siendo el efecto más dramático para la cepa C17, que en presencia del gen *oxrA* silvestre presentó una inducción por anaerobiosis de 10 veces en contraste con la mutante *oxrA*, que no presentó inducción por anaerobiosis. Estos resultados sugieren que la inserción MudJ de las cepas C17 y DD46 interrumpe un gen cuya expresión es dependiente de OXR A.

Se estudió posteriormente si este fenotipo de regulación era transferido a las cepas después del "backcross". Para ello se escogió la cepa C17 y sus derivadas TyT2161 y MA5419. Se introdujo la mutación *oxrA::Tn10* en estas últimas, y se midió la actividad β -galactosidasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El resultado mostrado en la Figura 12 indica que la cepa TyT2161, al igual que la cepa C17, induce la expresión génica en anaerobiosis 8 a 10 veces respecto al nivel obtenido en aerobiosis.

TABLA 10. Efecto de la mutación *oxrA* sobre las mutantes de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis

Cepas ^a	Actividad β -galactosidasa ^b		
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Inducción
NN19	1201	2520	2.1
NN19 <i>oxrA2::Tn10</i>	599	1068	1.8
JJ3	477	1841	3.9
JJ3 <i>oxrA2::Tn10</i>	390	1277	3.4
DD46	363	1968	5.4
DD46 <i>oxrA2::Tn10</i>	531	920	1.7
C17	17	163	9.6
C17 <i>oxrA2::Tn10</i>	14	17	1.2

a: Las mutantes *oxrA2::Tn10* fueron obtenidas por transducción de la mutación desde la cepa MST 2970 y seleccionadas por resistencia a Tet.

b : Los valores de actividad β -galactosidasa están expresados en unidades Miller (Miller, 1972) y corresponden a un experimento representativo. Cada experimento fue repetido al menos tres veces.

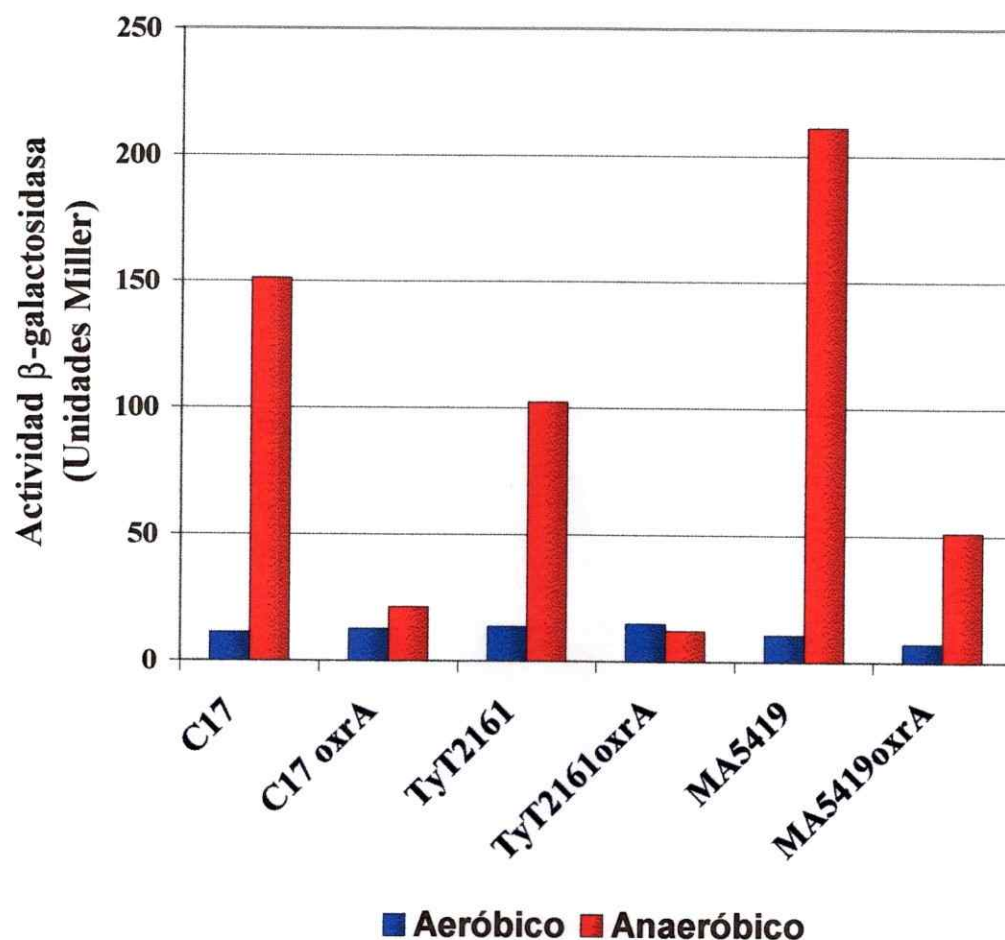


Figura 12. Efecto de la mutación *oxrA* en la regulación de la expresión del probable gen *fdhF* de *S. typhi*. Se introdujo la mutación *oxrA*::Tn10 mediante transducción a las cepas de *S. typhi* C17 y TyT2161, y a la cepa de *S. typhimurium* MA5419. Todas las cepas fueron crecidas hasta fase exponencial temprana en LB en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La actividad β -galactosidasa fue determinada en triplicado al menos en tres ensayos independientes. La desviación estándar fue menor al 10%.

Este aumento no se detectó cuando la cepa contiene la mutación *oxrA*, observándose niveles similares en aerobiosis y anaerobiosis. La cepa MA5419, que corresponde a una *S. typhimurium*, también disminuyó la inducción registrada en anaerobiosis cuando contenía la mutación *oxrA*, sin embargo, la expresión en anaerobiosis fue aún 5 veces mayor que en aerobiosis, lo cual sugiere que existen otras vías de regulación que inducen la expresión de este gen en *S. typhimurium*.

La enzima formiato deshidrogenasa, FdhH, codificada por el gen *fdhF* de *E. coli*, forma parte del complejo formiato-hidrógeno liasa, que constituye una importante vía de la fermentación anaeróbica, catalizando la reacción de descomposición del formiato a hidrógeno y anhídrido carbónico. Se expresa en condiciones anaeróbicas en ausencia de aceptores de electrones exógenos. La regulación del gen estructural de esta enzima, *fdhF*, es compleja. La transcripción del gen es dependiente del factor sigma 54 (σ^{54}) (Axley y col., 1990). Además es activada transcripcionalmente por la presencia de formiato a través del regulador FhlA (Birkmann y col., 1987; Rossmann y col., 1991; Hopper y col., 1994). Por otra parte, es inactivada por la presencia de oxígeno, nitrato y TMAO (Birkmann y col., 1987; Abaibou y col., 1997).

Para determinar si la regulación de la expresión del gen mutado en la cepa C17 presenta un perfil similar al descrito para el gen *fdhF* de *E. coli*, se hicieron mediciones de la actividad β -galactosidasa creciendo la cepa C17 y las cepas derivadas de C17 en presencia de formiato, nitrato y TMAO, siempre en condiciones anaeróbicas. Como se observa en la Figura 13, la mutante C17 y la derivada *S. typhi* TyT2161 no presentaron

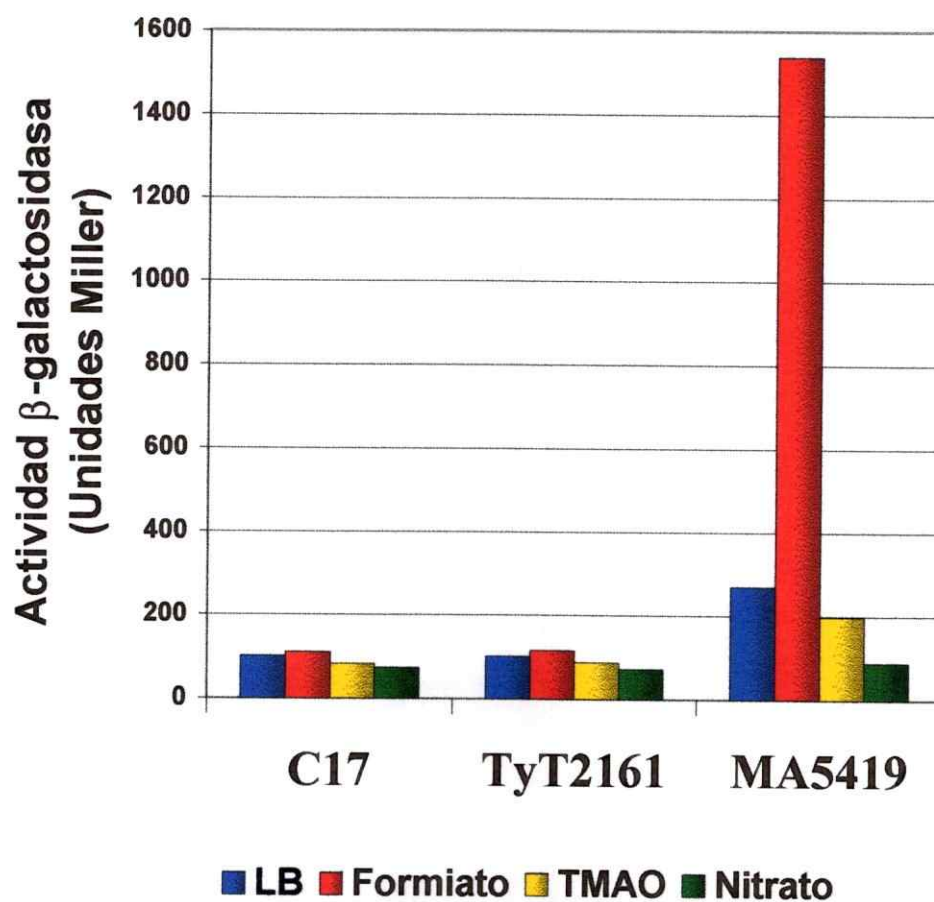


Figura 13. Regulación de la expresión del probable gen *fdhF* de *S. typhi* en distintas condiciones de crecimiento. Las cepas de *S. typhi* C17 y TyT2161, y *S. typhimurium* MA5419 fueron crecidas en LB y en LB suplementado con formiato de sodio, nitrato de potasio o TMAO. Las bacterias fueron crecidas hasta fase exponencial temprana en condiciones anaeróbicas y luego se determinó la actividad β -galactosidasa. Los resultados graficados representan el promedio de dos ensayos independientes realizados en triplicado. La desviación estándar fue menor al 10%.

mayores cambios en la expresión de β -galactosidasa al variar las condiciones de cultivo, es decir, la presencia de formiato, nitrato o TMAO en el medio de cultivo no modificó significativamente la expresión del gen mutado por MudJ. Sin embargo, la expresión de este gen fue notablemente activada por la presencia de formiato en la cepa de *S. typhimurium* MA5419 (Fig. 13), resultado sorprendente si se considera que se trata de la misma inserción MudJ presente en las cepas de *S. typhi* (demostrado mediante Southern y corroboración de fenotipo asociado). Este resultado sugiere que la regulación del mismo gen difiere entre *S. typhi* y *S. typhimurium*, siendo en esta última similar a lo descrito para *E. coli*.

Por otro lado, se sabe que la expresión del gen *fdhF* de *S. typhimurium* es inducida por formiato aún en ausencia del regulador OxrA (Jamieson y Higgins, 1986). Se ensayó la actividad β -galactosidasa de las mutantes TyT2161 y MA5419 con la mutación *oxrA::Tn10*, crecidas en presencia de formiato en el medio de cultivo. Se observó nuevamente que la presencia de formiato no modificó la expresión génica en la cepa de *S. typhi* TyT2161 *oxrA*. Por el contrario, la mutante MA5419 *oxrA* aumentó la expresión del gen mutado en presencia de formiato (Fig 14). Este comportamiento había sido descrito para el gen *fdhF* de *E. coli* y *S. typhimurium* (Birkmann y col., 1987; Jamieson y Higgins, 1986).

Los resultados obtenidos indican que la mutación en la cepa C17 transferida a *S. typhi* y *S. typhimurium* presenta un patrón de regulación distinto en ambas especies.

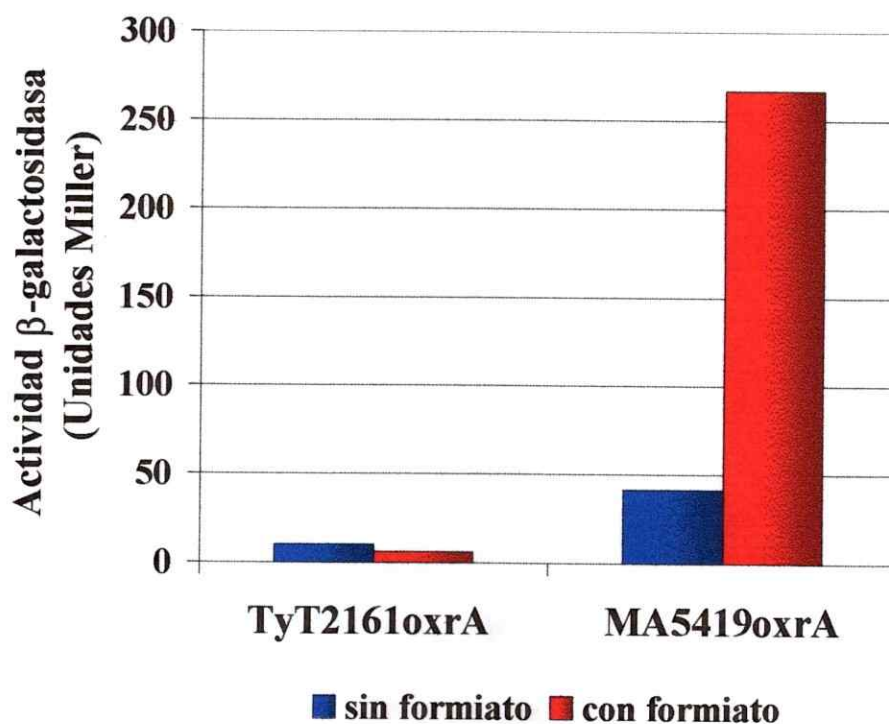


Figura 14. Efecto de la presencia de formiato sobre la expresión del probable gen *fdhF* en *S. typhi* y en *S. typhimurium* Se introdujo la mutación *oxrA::Tn10* mediante transducción a la cepa de *S. typhi* TyT2161 y a la cepa de *S. typhimurium* MA5419. Ambas cepas fueron crecidas hasta fase exponencial temprana en condiciones anaeróbicas en LB y en LB suplementado con formiato de sodio 30mM. La actividad β -galactosidasa fue determinada en triplicado al menos en tres ensayos independientes. La desviación estándar fue menor al 10%.

4. Caracterización del gen interrumpido en la mutante DD46

Siguiendo la misma estrategia empleada para el clon C17, se obtuvieron los derivados MudP y MudQ a partir de la cepa DD46 transferida a *S. typhimurium*. Se prepararon ambos lisados y cada uno fue secuenciado usando el sistema *fmol* con el partidador del extremo de Mu correspondiente a cada MudP22.

De acuerdo a los resultados comparando en un banco de datos, mediante el programa BLAST, la secuencia obtenida desde el lisado MudP, de 280pb, presentó 79 pb idénticos de 100 comparados (sin introducir gaps), con la secuencia del gen *uxaC* de *E. coli* (alrededor de un 80% de similitud). La secuencia obtenida desde el lisado MudQ, correspondiente a la secuencia río arriba respecto a la inserción MudJ en la cepa DD46, presentó 51 pb idénticas en un fragmento de 63 pb, con el gen *uxaC* (aproximadamente un 80% de similitud). Ambas secuencias estarían indicando que la inserción MudJ está ubicada a 370-375 pb respecto al codón ATG del gen.

Se diseñó un par de partidores para amplificar un segmento que incluyera la zona de inserción MudJ, usando como referencia las zonas de mayor homología. Sin embargo, en este caso sólo se logró amplificar el fragmento esperado en *E. coli* silvestre, no se obtuvo productos de amplificación con DNA de *S. typhi* ni *S. typhimurium* silvestres, aún al bajar la temperatura de alineamiento desde 56° a 50°C. Sería necesario por lo tanto modificar los partidores usados para amplificar una región dentro del gen para confirmar la existencia de un gen homólogo en *S. typhi*.

El gen *uxaC* de *E. coli* corresponde al gen estructural para la enzima uronato isomerasa, ubicado en el mapa de *E. coli* en el minuto 69,5 y forma parte del operón *uxaCA*, que participa en el metabolismo de los hexuronatos (Mata-Gilsinger y Ritzenhaler, 1983). No se han descrito genes homólogos a éste ni en *S. typhi* ni en *S. typhimurium*, sólo en *Erwinia chrisantemi*. La inserción MudJ de la cepa DD46 fue mapeada entre el minuto 67 y 69, que concuerda con la ubicación del gen *uxaC* de *E. coli*, lo cual indicaría junto a la información de la secuencia que existiría un gen homólogo a *uxaC* en *S. typhi* regulado en anaerobiosis e involucrado en la capacidad de invadir cultivos celulares.

DISCUSIÓN

El estudio presentado en esta tesis se centra en el desarrollo de un método de transferencia de marcadores cromosomales desde mutantes de *S. typhi* a *S. typhi* silvestre, para caracterizar genéticamente algunas mutantes que presentan la capacidad de invasión a células epiteliales disminuída respecto a la cepa silvestre.

Uno de los puntos importantes en la caracterización genética de una bacteria se refiere a la transferencia de una mutación desde la bacteria mutante a otra con genoma silvestre (backcross), para así verificar que el fenotipo observado en la mutante está directamente relacionado a la mutación estudiada. Esta estrategia es fácilmente realizable cuando se cuenta con fagos transductores que permiten hacer esta transferencia en una sola etapa; éste no es el caso para *S. typhi*, ya que no se dispone de esta valiosa herramienta genética. En general, *S. typhi* no cuenta con una estrategia experimental de rutina que permita transferir cualquier marcador cromosomal a otra *S. typhi*. Es por ello que se dio especial énfasis en este trabajo de tesis al desarrollo de un método que permitiera llevar a cabo la transferencia de marcadores cromosomales entre cepas de *S. typhi* o desde *S. typhi* a *S. typhimurium*.

El intercambio genético de marcadores cromosomales se realiza en la naturaleza desde una bacteria dadora a otra bacteria receptora mediante uno de tres mecanismos conocidos: **transformación**, que involucra la captación de DNA libre desde el

medioambiente; **conjugación**, proceso que requiere contacto entre la bacteria dadora del DNA y la receptora; y **transducción**, proceso en el cual la transferencia de DNA es mediado por un virus bacteriano (Madigan y col., 1997).

La capacidad de una bacteria de ser transformada, llamada estado de competencia, depende de su estado fisiológico en aquellas bacterias que son transformadas naturalmente, como *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*. En la práctica es posible inducir este estado competente tratando las bacterias con químicos apropiados en condiciones adecuadas. Los métodos más comunes usan shock hipotónico de Ca^{2+} . Actualmente se usan métodos de mayor eficiencia como la electroporación (electrotransformación), que consiste en exponer a la bacteria a un pulso eléctrico de alto voltaje, induciendo la formación de pequeños poros transientes lo cual permite la captación del DNA transformante (Madigan y col., 1997). La naturaleza del DNA usado para transformar incluye plasmidios circulares y lineales además de DNA cromosomal (Cosloi y Oishi, 1973; Russel y col., 1989). *S. typhi* puede ser transformada eficientemente mediante electroporación (O'Callaghan y Charbit, 1990), pero presenta la limitante que el marcador cromosomal que se quiere transferir debe clonarse en un plasmidio previamente.

Los estudios genéticos mediante conjugación en *S. typhi*, requieren de la disponibilidad de una colección de cepas *Hfr* (high frequency recombinant) de *S. typhi* que permitan tener representado el cromosoma completo. Usando esta estrategia ha sido posible mapear algunos genes y comparar la distancia y el orden de genes ligados entre cepas de *Salmonella* o desde *Salmonella* a *E.coli*. Así, mediante conjugación entre

marcadores cromosomales conocidos desde *E. coli* a *S. typhi*, fue posible localizar los genes *viaA* y *viaB*, necesarios para la síntesis del antígeno Vi (Johnson y col., 1965). Sin embargo, la conjugación entre especies distintas no es eficiente y las cepas resultantes no siempre son estables, impidiendo de esta forma aplicar esta herramienta al análisis general del cromosoma de *S. typhi*. (Johnson y col., 1971).

Estudios posteriores demostraron que la baja eficiencia de recombinación durante la conjugación entre *E. coli* y *S. typhimurium* era consecuencia de la actividad del sistema de reparación "mismatch". La anulación de los genes correspondientes, *mutS* y *mutL*, aumentaron significativamente la eficiencia de este evento, aún cuando existe alrededor de un 15% de divergencia entre el material genético de estas especies (Raysiguer y col., 1989; Sharp, 1991), lo cual sugiere que este sistema de reparación es un potente inhibidor de la recombinación homóloga entre especies distintas. Otras mutaciones en la cepa receptora de la conjugación entre *E. coli* y *S. typhimurium*, no tuvieron efectos en la eficiencia, como por ejemplo la anulación del sistema RecBCD que posee la actividad enzimática ExoV. Tampoco tuvo efecto la mutación del sistema de restricción tipo I, dependiente de los genes *hsd*. Sin embargo, la inducción del sistema SOS sí logró aumentar la frecuencia de recombinación, al parecer a través del aumento de la proteína RecA (Matic y col., 1995).

La transferencia de marcadores cromosomales mediante transducción en *S. typhi* está limitada, en la práctica, al intercambio desde *S. typhimurium* hacia *S. typhi*, usando como fago transductor generalizado a P22HT \int int (Schmieger, 1972). Notablemente, este fago no es capaz de lisar *S. typhi*, por lo que tampoco es capaz de transferir DNA desde

S. typhi a otra *S. typhi* o a *S. typhimurium*. Se han descrito anteriormente otros fagos transductores para *S. typhi* (Baron y col., 1955; Mise y col., 1981; Cerquetti y Hooke, 1993), pero no han sido usados metódicamente dada la inestabilidad de los lisados, la baja eficiencia de transducción y la limitación de la cepa receptora, que debe ser antígeno Vi positiva. Es necesario destacar que no todas las cepas de *S. typhi* poseen el antígeno capsular Vi, incluyendo la cepa Ty2 crecida en las condiciones de laboratorio.

Considerando estos antecedentes, se planteó como método alternativo para transferir marcadores cromosomales entre *Salmonellas* la electrotransformación, usando DNA cromosomal lineal de *S. typhi* para transformar *S. typhimurium*. Para ello se usaron mutantes de *S. typhimurium* en el complejo RecBCD y para aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga entre ambas especies, se utilizaron cepas receptoras que además presentaran mutaciones en el sistema de reparación "mismatch" (*mutSL*) y en el sistema de restricción dependiente de los genes *hsd*.

La transferencia de marcadores cromosomales desde *S. typhi* a *S. typhimurium* requiere de la presencia de genes homólogos en *S. typhimurium*. Ambas especies están estrechamente relacionada, de hecho, presentan entre 97 a 98% de identidad en su material genético (Crosa y col., 1973). Sin embargo, *S. typhi* tiene una organización física del cromosoma diferente de *S. typhimurium*. Análisis del DNA cromosomal digerido con la enzima I-Ceu I (cuyo sitio de corte está en el cistron del rRNA 23S), mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), indican que el orden de los fragmentos en *S. typhimurium*, *E. coli* y otras especies de *Salmonella*, es altamente conservado. *S. typhi* en cambio, presenta reordenamientos probablemente debido a

recombinaciones homólogas entre los genes *rrn*, que codifican para RNA ribosomales (Liu y Sanderson 1995a). En *S. typhi* existen varias inserciones que no están presentes en *S. typhimurium* y un segmento del DNA invertido respecto a *S. typhimurium* que incluye la región del término de la replicación (Ter). No obstante estas diferencias, el orden de los genes dentro de los fragmentos es notablemente conservado, lo cual permite llevar a cabo la transferencia de gran parte de los genes de *S. typhi*.

Un antecedente importante que permitió utilizar DNA cromosomal lineal en la electrotransformación, fue el hecho que, en *S. typhimurium*, la eficiencia de transducción de marcadores de gran tamaño como MudA, de 38 kb, aumentó hasta 60 veces al usar una mutante *recD* como receptora respecto a la cepa *recD*⁺ (Miesel y Roth, 1994). Es sabido que mutaciones en *recD* inactivan la exonucleasa del complejo RecBCD, manteniendo la actividad helicasa (Miesel y Roth, 1994). De esta forma, se minimizaría la degradación del DNA que entra a la mutante *recD*, favoreciendo los eventos de recombinación homóloga que permiten incorporar el marcador seleccionado. También se reportó para *E. coli*, que la mutación *recD* permite integrar al cromosoma marcadores de DNA plasmidial lineal, los que en general son rápidamente degradados (Raysiguiet y col., 1989). Existen mutantes de *E. coli* en el complejo *recBCD*, que son deficientes en recombinación, pero que en presencia de mutaciones supresoras intergénicas del tipo *sbcB*, que eliminan la actividad Exonucleasa I, restituyen la capacidad de recombinación y permiten transformar con DNA lineal (Kuschner y col., 1972). Los resultados de este trabajo de tesis son consistentes con estos antecedentes, ya que sólo fue posible transformar *S. typhimurium* con DNA lineal cuando la cepa receptora presentaba mutaciones en el complejo RecBCD (Tabla 2 y 3). Se demostró por lo tanto que *S.*

typhimurium puede ser transformada con DNA lineal, ya sea de origen plasmidial o cromosomal. Sorprendentemente, el comportamiento de *S. typhi* fue distinto, puesto que no fue necesario introducir mutaciones en estos sistemas para obtener transformantes con DNA lineal. La mayor eficiencia de transformación, sin embargo, fue obtenida con la cepa Ty2 *recDmutS* (Tabla 6).

Se ha reportado que la transferencia de DNA desde *S. typhimurium* a *S. typhi* mediante transducción, presenta baja eficiencia (Zahrt y col., 1994). Al introducir la mutación *mutS* en la cepa de *S. typhi* receptora, se logró aumentar la frecuencia de transducción, siendo aún aproximadamente 10^3 veces menor a la observada para la transferencia de marcadores entre cepas de *S. typhimurium* (Zahrt y col., 1994). Sólo se aumentó a niveles similares a los obtenidos durante las transducciones intraespecie, cuando coexistieron en la cepa receptora las mutaciones *mutS* y *recD* (Zahrt y Maloy, 1997). Este resultado sugiere la participación del complejo *mutSL* como mecanismo de restricción a la entrada de DNA foráneo, favoreciendo su degradación. De acuerdo a estos antecedentes, era posible esperar que, al usar DNA de *S. typhi* para transformar mutantes *recD mutS* de *S. typhimurium*, la eficiencia aumentara a niveles similares a los valores observados al transformar con DNA de *S. typhimurium*. Esto no sucedió, sugiriendo la participación de otros sistemas, como por ejemplo algún sistema de restricción-modificación, que eventualmente podría disminuir la frecuencia de transformación al eliminar el DNA de *S. typhi*, antes que los eventos de recombinación se lleven a cabo.

La transferencia de marcadores MudJ desde *S. typhi* a *S. typhimurium*, fue ensayada en primer lugar con mutantes auxotróficas de *S. typhi* construídas por transducción desde mutantes conocidas de *S. typhimurium*. Las cepas resultantes por lo tanto son híbridos que poseen el marcador de *S. typhimurium*. Usando estos marcadores *leuA*, *hisC* y *proU* se pudo detectar diferencias en la eficiencia de transferencia, sugiriendo que la ubicación de los genes en el cromosoma (57,6; 44,8; 61,4 respectivamente) también influiría en la frecuencia de transformación (Maloy y col., 1994). Lo mismo se pudo detectar al usar el DNA de estas cepas para transformar *S. typhi* silvestre y las mutantes *recD*, *mutS* y *recDmutS* (Tabla 6).

La baja eficiencia general de estas transformaciones podría explicarse por el procedimiento utilizado para internalizar el DNA a la bacteria, que no permite controlar la integridad del DNA ni el tamaño de los fragmentos que ingresan a la bacteria, a diferencia de lo que ocurre cuando el DNA es internalizado en la bacteria receptora a través de un fago o mediante conjugación.

Aún cuando se registraron bajas frecuencias de transferencia, esta estrategia presenta grandes ventajas para nuestro trabajo, puesto que facilita el traspaso de la mutación a un contexto genético silvestre de *S. typhimurium*, lo cual permite no sólo corroborar la relación entre la mutación y el fenotipo determinado por esta mutación, sino que también permite estudiar la mutación en un organismo que cuenta con las herramientas genéticas para mapear, clonar y secuenciar en forma simple y rápida. Además, una vez que la mutación es transferida a *S. typhimurium*, es posible estudiar el efecto de esta mutación *in vivo*, es decir, determinar la virulencia sobre el hospedero, ya

que se puede ensayar en el ratón. De esta forma, se puede evaluar y estudiar el efecto de la mutación obtenida en *S. typhi* sobre la virulencia de *S. typhimurium*.

Una vez transferidas las inserciones MudJ de las mutantes de *S. typhi* a *S. typhimurium*, éstas fueron localizadas en el cromosoma de la cepa receptora, de acuerdo al mapa genético ya descrito (Sanderson y col., 1995). Conociendo la ubicación de las mutaciones en el mapa de *S. typhimurium*, fue posible referirlas al mapa del cromosoma de *S. typhi* (Liu y Sanderson 1995b). Aún cuando sólo se ha establecido la localización física de un centenar de genes, fue posible estimar la posición de los genes mapeados en este trabajo, respecto al mapa de *S. typhi*. De esta forma la mutación de la cepa NN19 y la cepa JJ3, localizadas en la región del minuto 17 al 19, se ubicaron en la misma región en el mapa de *S. typhi*, entre los minutos 17 y 19. En cambio, la cepa DD46 cuya inserción MudJ fue encontrada en la región del minuto 67 al 69 de *S. typhimurium*, quedó en la región del minuto 95 al 97 de *S. typhi*. La cepa C17 ubicada en la región del minuto 91 al 93, estaría en la región del minuto 69 al 71 del mapa de *S. typhi*. Las diferencias se deberían a los reordenamientos que presenta el cromosoma de *S. typhi* respecto a *S. typhimurium* (Liu y Sanderson 1995a).

Otra ventaja de esta estrategia es la posibilidad de transferir la mutación desde la mutante de *S. typhi* a *S. typhi* silvestre (backcross) por un método indirecto, ya que se puede transducir la mutación una vez transferida a *S. typhimurium*, desde el cromosoma de esta bacteria a *S. typhi*, mediante el fago P22. Además, se logró transferir la mutación MudJ desde *S. typhi* directamente a una *S. typhi* silvestre, transformándola con el DNA cromosomal de la mutante. Este resultado fue inesperado, puesto que no se ha

reportado en *S. typhimurium* o en *E. coli* silvestre, la susceptibilidad de ser transformadas con DNA lineal.

Particularmente en este trabajo, se logró identificar genes involucrados en la capacidad de *S. typhi* de invadir células epiteliales, a partir de una colección de mutantes inducidas en anaerobiosis. Un ejemplo interesante lo constituye la cepa C17, mutante que poseía dos inserciones MudJ, como se demostró por hibridación Southern. Mediante electroporación, se logró transferir una de las inserciones MudJ a la cepa silvestre. La actividad β -galactosidasa de la cepa original y las mutantes derivadas de ella fue cuantitativamente similar. Esto sugiere que la segunda inserción en la cepa C17 no presenta actividad β -galactosidasa, probablemente porque MudJ está en orientación contraria a un promotor. Por otro lado, la reconstitución del fenotipo estudiado en la cepa C17, tanto a nivel de la regulación de la expresión del gen mutado en anaerobiosis como a nivel del fenotipo invasor disminuído, también fue observado en las mutantes obtenidas a partir de ella: *S. typhi*, TyT2161, *S. typhimurium* MA5419 (derivada de LT2) y *S. typhimurium* MA5442 (derivada de la cepa virulenta 14028). Este resultado sugiere por lo tanto que la inserción MudJ que fue transferida es la responsable del fenotipo invasor disminuído.

Paralelamente, se logró clonar un fragmento de DNA de la cepa C17, que contenía el gen de resistencia a Kan del MudJ y la región de DNA cromosomal adyacente a la inserción, en el plasmidio pCT17. A partir de este clon se obtuvo la secuencia de dos fragmentos de la región 3' de la inserción MudJ: uno de 400 pb y el

otro de 250 pb. Al comparar ambas secuencias, mediante el programa BLAST, se detectó una alta similitud con la secuencia del gen *fdhF* de *E. coli*, que codifica para la enzima formiato deshidrogenasa, FdhH (Zinoni y col., 1986).

Nuestros resultados indican por lo tanto, que la mutante *S. typhi* C17 presenta una inserción MudJ en el gen homólogo *fdhF*. No sólo concuerdan con la identificación de este gen la secuencia de la región adyacente al fago MudJ, sino también la amplificación de fragmentos de tamaño similar a los obtenidos para *E. coli* y *S. typhimurium*, usando partidores diseñados para *fdhF* de *E. coli*. Además, el gen mutado fue localizado en la región del minuto 91 al 93 en el cromosoma de *S. typhimurium*, lo cual coincide con la ubicación del gen *fdhF* de *S. typhimurium* en el minuto 92,8 y en el minuto 92,4 del mapa de *E. coli*.

S. typhi es, al igual que *S. typhimurium* y *E. coli*, una bacteria anaeróbica facultativa, que puede crecer en ambientes anaeróbicos mediante respiración anaeróbica usando nitrato como aceptor final de electrones o metabolitos como fumarato, dimetil sulfóxido (DMSO), TMAO o mediante fermentación en ausencia de aceptores de electrones externos.

Uno de los complejos enzimáticos utilizados durante la fermentación es el denominado formiato-liasa, que cataliza la conversión de formiato a CO₂ e H₂. La enzima formiato deshidrogenasa, FdhH, forma parte de este complejo. Una característica importante de esta proteína es que corresponde a una selenoproteína tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*. La transcripción del gen estructural de esta enzima *fdhF* de *E.*

coli es dependiente de σ^{54} ; es inducida en condiciones fermentativas de crecimiento, especialmente en presencia de formiato y pH ácido, a través del regulador transcripcional FhlA (Axley y col., 1990; Rossman y col., 1991; Hopper y col., 1994) y es reprimida en presencia de oxígeno y nitrato (Birkmann y col., 1987). OxrA (o Fnr), uno de los reguladores globales de anaerobiosis, también es capaz de inducir la expresión de *fdhF* en ambientes de baja disponibilidad de oxígeno. El gen homólogo *fdhF* de *S. typhimurium* sería regulado de manera similar (Jamieson y Higgins, 1986; Birkmann y col., 1987). Nuestros resultados, para el caso de *S. typhimurium*, concuerdan con este perfil de regulación, puesto que la expresión del gen en la cepa MA5419 es activada en presencia del sustrato formiato y es inducida por OxrA en anaerobiosis. Existiría además otro(s) regulador(es) para este gen, ya que se observa un aumento de hasta 5 veces en anaerobiosis respecto a la expresión en aerobiosis, en ausencia de OxrA (Fig. 12). Sin embargo, la regulación de este gen en *S. typhi* es notablemente distinta, ya que la inducción en anaerobiosis detectada en la cepa TyT2161 es estrictamente dependiente de OxrA y no se induce en presencia de formiato (Fig. 11 y 12).

Estos resultados sugieren que *S. typhi* no tiene un regulador equivalente a FhlA o si existe, éste presenta una actividad distinta a la descrita para *S. typhimurium* y *E. coli*. La primera alternativa parece interesante de explorar, puesto que ya existen evidencias de una delección en *S. typhi* dentro de la SPI 1 en un gen adyacente a *fhlA* de *S. typhimurium* ubicado en el minuto 62,8 del cromosoma. Se demostró que en el minuto 62,9 del cromosoma de *S. typhimurium* existe el gen *avrA*, formando parte de la SPI 1 y que codifica para una proteína de secreción. Este gen no está presente en *S. typhi* (Hardt y Galán, 1997). Sería factible entonces pensar que los eventos de recombinación que

permitieron la integración de la SPI 1 en *S. typhi*, a diferencia de *S. typhimurium*, resultaron en deleciones de los genes adyacentes a la región de integración, como el correspondiente *fhIA*.

Estudios de la actividad enzimática formiato deshidrogenasa, cuyo gen estructural es *fdhF*, podrían aportar importante información respecto a la identidad de esta proteína en *S. typhi*. En este trabajo, no fue posible detectar la actividad enzimática en *S. typhimurium* ni en *S. typhi* silvestres, sólo fue medida en *E. coli*, hecho que no permitió establecer el comportamiento de las mutantes respecto de este fenotipo (resultados no mostrados). Las condiciones de ensayo imponen anaerobiosis estricta, dado que el residuo de selenocisteína presente en esta enzima es altamente reactivo con oxígeno, y probablemente la enzima en *Salmonella* es más lábil que la correspondiente en *E. coli*. La diferencia de secuencia de la proteína deducida para *S. typhi* en el extremo C-terminal respecto a la proteína de *E. coli* podría tener efectos sobre la actividad enzimática que dificultan su detección.

Si bien, la participación directa de este gen en los mecanismos de invasión a células epiteliales no es evidente, es posible sugerir que, dada la fina regulación de la expresión del gen *fdhF* por las condiciones ambientales, esta actividad enzimática o la presencia de esta proteína sea necesaria en un momento crítico durante la infección al hospedero, por ejemplo, una vez que la bacteria es internalizada por la célula epitelial, donde se producen cambios en el medio que rodea a la bacteria.

Se ha reportado que la alta osmolaridad del medio de cultivo tendría efectos inhibitorios sobre el metabolismo anaeróbico de *E. coli*, particularmente sobre el metabolismo fermentativo, como lo demuestra la inhibición total de la actividad enzimática formiato deshidrogenasa junto a la inhibición parcial de la expresión del gen estructural de esta enzima, *fdhF*. Este efecto no fue tan severo con la actividad nitrato reductasa, enzima característica de la vía respiratoria anaeróbica (Gouesbet y col., 1993). Alta osmolaridad y anaerobiosis son condiciones que la bacteria encuentra durante su paso por la barrera epitelial del intestino, al invadir las células epiteliales. Sería necesario determinar cuál de ambas condiciones tiene mayor efecto sobre la actividad de esta enzima *in vivo*, durante el contacto de la bacteria con la barrera epitelial.

El efecto de la osmolaridad en *fdhF* de *S. typhimurium* no ha sido estudiado, pero se sabe que en anaerobiosis este gen es inducido, por lo que podría esperarse que la actividad formiato deshidrogenasa también fuera alta durante el encuentro de la bacteria con la célula epitelial. Siendo el metabolismo fermentativo su más importante fuente de energía, durante el encuentro con la célula eucariótica a nivel del intestino, sería predecible que bacterias mutadas en esta vía presenten desventajas en el proceso de invasión.

Considerando que MudJ genera mutaciones por inserción con efectos polares, es posible suponer que la mutación en el gen homólogo a *fdhF* en *S. typhi* no sea el responsable directo de la deficiencia en la capacidad de invadir cultivos celulares, sino genes río abajo de la inserción de MudJ, cuya expresión es afectada por el transposón. Esta alternativa es difícil de descartar al hacer la transferencia de la mutación, ya que el

efecto polar persistiría. Sería necesario por ejemplo, generar mutaciones no polares directamente en el gen y determinar el efecto sobre el fenotipo invasor de la cepa resultante. Favorece esta alternativa, el hecho que se describiera recientemente una nueva isla de patogenicidad en *S. typhimurium*, localizada en el minuto 92, entre los genes *ssb* y *soxSR* (Wong y col., 1998). Esta SPI de 25kb, fue completamente secuenciada y entre las proteínas deducidas se encontró gran similitud con proteínas involucradas en la secreción de una toxina. Sería posible entonces que la inserción MudJ en la cepa C17 afectara la expresión de genes pertenecientes a esta SPI 4, que participan en forma directa en la invasión a células epiteliales.

El análisis de la mutante DD46 se basó en la secuenciación de los segmentos de DNA que flanquean la inserción MudJ y en la localización del gen mutado en el cromosoma de *S. typhimurium*. Se logró secuenciar un fragmento de 110 pb río arriba de la inserción MudJ y uno de 190 pb río debajo de la inserción. El alineamiento realizado mediante el programa BLAST, reveló un 80% de residuos idénticos con el gen *uxaC* de *E. coli*, en un fragmento de 63 pb correspondientes a la secuencia río arriba de la inserción MudJ. En tanto que la secuencia del otro lado de MudJ mostró un 75% de residuos idénticos al gen *uxaC* en un fragmento de 56 pb. El gen *uxaC* se encuentra en el minuto 69,5 en el mapa de *E. coli*, que sería equivalente a la región en que fue mapeada la inserción MudJ de la cepa DD46, en la región del minuto 67-69. Estos antecedentes sugieren por lo tanto que el gen homólogo a *uxaC* de *E. coli* presenta la inserción MudJ en esta cepa.

Al igual que con la cepa C17, se intentó amplificar una zona del probable gen mutado en la cepa DD46, diseñando partidores desde la secuencia del gen de *E. coli*. Pero, en este caso no fue posible obtener productos de amplificación con los DNA de *S. typhi* ni *S. typhimurium*. Este resultado y la secuencia obtenida sugieren una mayor divergencia para el gen *uxaC*. No se ha descrito este gen en *S. typhimurium*, ni se conoce una función fisiológica del producto génico en *Salmonella*, sin embargo, en el fitopatógeno *Erwinia chrysanthemi* se ha caracterizado la función del gen *uxaC* en relación a la vía de degradación de los poligalacturonatos. Esta bacteria posee un importante arsenal de proteínas que le permite despolimerizar la pectina en la pared celular vegetal y utilizar los productos (galacturonatos) como única fuente de carbono. Para ello, requiere de una maquinaria enzimática intracelular que le permita aprovechar estos derivados, y el locus *exuT* (sistema de transporte para aldohexuronatos) y el operón *uxaCA* (uronato isomerasa y altronato deshidratasa) le permiten a la bacteria llevar a cabo la metabolización de los productos. Estos genes son regulados por condiciones ambientales, entre ellos anaerobiosis, hecho que es consistente con la regulación observada para la mutante DD46 (Hugouvieux-Cotte-Pattat y col., 1992). No está claro cuál es la relación que una función similar pudiera tener en el fenotipo de invasión en *S. typhi*, tampoco es posible establecer cuál de los genes tiene efectos sobre el fenotipo observado en *S. typhimurium* ya que la inserción MudJ afecta al operón *uxaCA*.

Como último comentario, es necesario señalar que el estudio del proceso de invasión a células epiteliales *in vitro* deja en evidencia que, en general, el metabolismo anaeróbico y fermentativo son importantes durante este proceso, de hecho, de las 10

mutantes obtenidas, 4 de ellas presentaron defectos relacionados al metabolismo anaeróbico, que podrán estar asociados a la virulencia de la bacteria.

CONCLUSIONES

- *Salmonella typhimurium* puede ser transformada con DNA cromosomal lineal de *S. typhi*, cuando se usa como receptora de la transformación mutantes en el complejo *recBCD* y *mutS*.
- *S. typhi* silvestre también puede ser transformada con DNA cromosomal lineal, pero presenta mayor eficiencia de transformación cuando la cepa receptora lleva las mutaciones *recBCD* y *mutS*.
- La transferencia de marcadores cromosomales desde *S. typhi* directamente a *S. typhi* silvestre, mediante electrotransformación con DNA lineal, constituye un método que permite hacer el "backcross" de una mutación en esta especie bacteriana.
- Usando esta metódica, se logró caracterizar la mutante *S. typhi* C17, que presenta un fenotipo de invasión a células epiteliales disminuído respecto a la cepa silvestre. Esta mutante tiene una inserción MudJ en el gen homólogo a *fdhF* de *E. coli*, gen que codifica para la enzima formiato deshidrogenasa, inducida en anaerobiosis en ausencia de aceptores de electrones exógenos.
- Este gen en *S. typhi* presentaría una regulación distinta a la descrita para *S. typhimurium* y *E. coli*, lo cual sugiere la ausencia del regulador transcripcional FhlA en *S. typhi*.

BIBLIOGRAFÍA

Abaibou, H., G. Giordano, y M-A. Mandrand-Berthelot. 1997. Suppression of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase activity by trimethylamine N-oxide is due to drainage of the inducer formate. *Microbiol.* **143**: 2657-2664.

Albertini, A., M. Hofer, M. Calos, y J. Miller. 1982. On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* **29**: 319-328.

Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, y D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, y K. Struhl. 1992. *Short protocols in Molecular Biology*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Axley, M., D. Grahame, y T. Stadtman. 1990. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. *J. Biol. Chem.* **265**: 18213-18218.

Bajaj, V., C. Hwang, y C. Lee. 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* **18**: 715-727.

Bajaj, V., R. Lucas, C. Hwang, y C. Lee. 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol.* **22**: 703-714.

Baker, S., C. Daniels, y R. Morona. 1997. Phop/Q regulated genes in *Salmonella typhi*: identification of mellitin sensitive mutants. *Microb. Pathogen.* **22**: 165-179.

Baron, L.S., S.B. Formal, y W. Spilman. 1955. Vi phage-host interaction in *Salmonella typhosa*. *J. Bacteriol.* **69**: 177-183.

Bäumler, A., J. Kusters, I. Stojiljkovic, y F. Heffron. 1994. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect. Immun.* **62**: 1623-1630.

Behlau, I., y S. Miller. 1993. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**: 4475-4484.

- Benson, N.R., y B.S. Goldman. 1992. Rapid mapping in *Salmonella typhimurium* with Mud-P22 prophages. *J. Bacteriol.* **174**:1673-1681.
- Betts, J. y B. Finlay. 1992. Identification of *Salmonella typhimurium* invasiveness loci. *Can. J. Microbiol.* **38**: 852-857.
- Bi, X., y L. Liu. 1994. RecA-independent and RecA-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* **235**: 414-423.
- Birkman, A., F. Zinoni, G. Sawers, y A. Böck. 1987. Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **148**: 44-51.
- Birnboim, H.C., y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
- Blanc-Potard, A., y E. Groisman. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**: 5376-5385.
- Casadaban, M., y Cohen, S. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using Mu-*lac* transducing phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4530-4533.
- Cerquetti M.C. y A.M. Hooke. 1993. Vi I typing phage for generalized transduction of *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **175**: 5294-5296.
- Clark, M., M. Jepson, N. Simmons, y B. Hirst. 1994. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* **145**: 543-552.
- Clarke, C., y Gyles, C. 1986. Galactose epimerase mutants of *Salmonella typhimurium* as live vaccines for calves. *Can J. Vet. Res.* **50**: 165-173.
- Collazo, C., M. Zierler, y J. Galán. 1995 Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.* **15**: 25-38.
- Collazo, C., y J. Galán. 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sips proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* **24**: 747-756.
- Collins, F. 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol Rev.* **38**: 371-402.
- Contreras, I. 1994. Efecto de la anaerobiosis sobre la capacidad de *Salmonella typhi* de penetrar y proliferar en células humanas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Contreras, I., C.S. Toro, G. Troncoso, y G.C. Mora. (1997) *Salmonella typhi* mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiol.* **143**: 2665-2672.

Contreras, I., Obreque, V., L.P. Blanco, C.S. Toro, y G.C. Mora. 1995. Anaerobically induced *Salmonella typhi* genes are involved in entry to and proliferation within human-derived cell lines. *South East Asian J. Trop. Med. Public Health* **26**: 110-117.

Contreras, I., V. Obreque, B. Tesser, y G.C. Mora. 1994. Mini-Mu technology in *Salmonella typhi*: isolation of stable MudJ operon fusions by *cis* complementation. *Biol. Res.* **27**: 233-239.

Cosloy, S.D., y M. Oishi. 1973. Genetic transformation of *Escherichia coli*.K12 *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**:84-87.

Crosa, J.H., D. Brenner, W Ewing, y S. Falkow. 1973 Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J. Bacteriol.* **115**: 307-315.

Dorman, C., y N. Ni Brhain. 1993. DNA topology and bacterial virulence gene regulation. *Trends Microbiol.* **1**: 92-98.

Dougan, G., D. Maskell, D. Pickard, y C. Hormaeche. 1987 Isolation of stable *aroA* mutants of *Salmonella typhi* Ty2: properties and preliminary characterisation in mice. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 402-405.

Elsinghorst, E., L. Baron, y D. Kopecko. 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5173-5177.

Finlay, B., y S. Falkow. 1988. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholera-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochemie* **70**: 1089-1099.

Finlay, B., y S. Falkow. 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* **3**: 1833-1841.

Foster, P., y J. Cairns. 1994. The occurrence of heritable *Mu* excisions in starving cells of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**: 5240-5244.

Francis, C., M. Starnbach y S. Falkow. 1992 Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* **6**: 3077-3087.

- Francis, C., T. Ryan, B. Jones, S. Smith y S. Falkow. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis. *Nature* **364**: 639-642.
- Galán, J., C. Ginocchio, y P. Costeas. 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.
- Galán, J., y R. Curtiss III. 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., y R. Curtiss III. 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**: 1879-1885.
- Galán, J., y R. Curtiss III. 1991. Distribution of *invA*, *-B*, *-C*, and *-D*, genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* **59**: 2901-2908.
- Galán, J.E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **26**:263-271
- García del Portillo, F. Y B. Finlay. 1994. *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect. Immun.* **62**: 4641-4645.
- Gari E, N. Figueroa-Bossi, A.B. Blanc-Potard, F. Spirito, M. B. Schmid, y L. Bossi 1996. A class of gyrase mutants of *Salmonella typhimurium* show quinolone-like lethality and require *rec* functions for viability. *Mol Microbiol* **21**: 111-122
- Ginocchio, C., J. Pace, y J. Galán. 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of *Salmonellae* into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5976-5980.
- Ginocchio, C., S. Olmsted, C. Wells, y J. Galán. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**: 717-724.
- Gouesbet, G., H. Abaidou, L. Wu, M.A. Mandrand-Berthelot y C. Blanco. 1993 Osmotic repression of anaerobic metabolic systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 214-221.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mulhodorfer, y H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, p. 109-135. En Glover Dm (ed.) DNA cloning techniques: a practical approach. vol 1 IRL Press, Oxford.

Hardt, W-D., y J. Galán. 1997. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 9887-9892.

Heithoff, D., C. Conner, P. Hanna, S. Julio, U. Hentschel, y M. Mahan. 1997. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 934-939.

Hensel, M., J. Shea, A. Bäumlér, C. Gleeson, F. Blattner, y D. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science **269**: 400-403.

Hermant, D., R. Menard, N. Arricau, C. Parsot, y M. Popoff. 1995. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. Mol. Microbiol. **17**: 781-789.

Higgins, D., y Sharp, P. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. CABIOS **5**: 151-153.

Hone, D., R. Morona, S. Attridge, y J. Hacket. 1987. Construction of a defined *galE* mutants of *Salmonella* for use as vaccines. J. Infect. Dis. **156**: 1167-1174.

Hone, D., S. Attridge, B. Forrest, R. Morona, D. Daniels, J. Labrooy, R. Chiron, A. Bartholomeusz, D. Skearman, y J. Hacket. 1988. A *galE via* (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect. Immun. **56**: 1326-1333.

Hopper, S., M. Babst, V. Schlensoy, H-M Fischer, H. Hennecke y A. Böck. 1994. Regulated expression *in vitro* of genes for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **269**: 19597-19604.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., H. Domínguez, y J. Robert-Baudouy. 1992. Environmental conditions affect the transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. J. Bacteriol. **174**: 7807-7818.

Isberg, R., y S. Falkow. 1985. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. Nature, **317**:262-264.

Jamieson, D. y C. Higgins. 1986. Two genetically distinct pathways for transcriptional regulation of anaerobic gene expression in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **168**: 389-397.

- Mise, K., M. Kawai, Y. Yoshida, y A. Nakamura. 1981. Characterization of bacteriophage j2 of *Salmonella typhi* as a generalized transducing phage closely related to coliphage P1. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 321-326.
- Mroczeni-Willey, M., J. Di Fabio, y F. Cabello. 1989. Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of lipopolysaccharide. *Microbial Pathogen.* **6**: 143-152.
- Nag, D., y E. Berg. 1987. Specificity of bacteriophage Mu excision. *Mol Gen. Genet.* **207**: 395-401.
- O'Callaghan, D.O. y A. Charbit. 1990. High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **223**:156-158.
- Ochman, H. y Groisman, E.A. 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**: 5410-5412.
- Owen, R., y A. Jones. 1974. Epithelial cells specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* **66**: 189-203.
- Pace, J., J. Hayman, y J. Galán. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. *Cell* **72**: 505-514
- Pang, T., Z.A. Bhutta, B.B. Finlay, y M. Altwegg. 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* **3**:253-255.
- Pascopella, L., B. Raupach, N. Ghori, D. Monack, S. Falkow, y P. Small. 1995. Host restriction of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* **63**: 4329-4335.
- Penheiter, K., N. Mathur, D. Giles, T. Fahlen y B. Jones. 1997. Non-invasive *Salmonella typhimurium* are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol. Microbiol.* **24**: 697-709.
- Porter, M., y C. Dorman. 1994. A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **176**: 4187-4191.
- Rayssiguier, C., D.S. Thaler, y M. Radman. 1989. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**:396-401.
- Rossmann, R., G. Sawers, y A. Bock. 1991 Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol. Microbiol.* **5**: 2807-2814.

- Roudier, C., M.Krause, J. Fierer, y D. Guiney. 1990. Correlation between the presence of sequences homologous to the *vir* region of *Salmonella dublin* plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two *Salmonella* serotypes in mice. *Infect. Immun.* **58**: 1180-1185.
- Russel, C.B., D.S. Thaler, y F.W. Dahlquist. 1989. Chromosomal transformation of *Escherichia coli recD* strains with linearized plasmids. *J. Bacteriol.* **171**:2609-2613.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanderson, K.E., A. Hessel, y K.E. Rudd. 1995. Genetic map of *Salmonella typhimurium*, Edition VIII. *Microbiol. Rev.* **59**:241-303.
- Schiemann, D., y S. Shope. 1991. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.* **59**: 437-440.
- Schmieger, H. 1972. Phage P22 mutants with increased or decreased transducing abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**: 75-88.
- Sharp, P. 1991. Determinants of DNA sequence divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: codon usage, map position, and concerted evolution. *J. Mol. Evol.* **33**: 23-33.
- Shea, J., M. Hensel, C. Gleeson, y D.Holden. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:2593-2587.
- Slauch, J., Taylor, R. y Maloy, S. 1997. Survival in a cruel world: how *Vibrio cholerae* and *S. typhimurium* respond to an unwilling host. *Genes & Development* **11**: 1761-1774.
- Spiro, S., y J. Guest. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 310-314.
- Squires C.H., M. DeFelice, C.T. Lago, and J.M. Calvo. 1983 *IlvHI* locus of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **154**: 1054-1063
- Stone, B., C. García, J. Badger, T. Hasset, R. Smith, y V. Miller. 1992. Identification of novel loci affecting entry of *Salmonella enteritidis* into eukaryotic cells. *J. Bacteriol.* **174**: 3945-3952.
- Takeuchi, A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* **50**: 109-136.

- Tartera, C., y E. Metcalf. 1993. Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.* **61**: 3084-3089.
- Toro, C.S., G. C. Mora, y N. Figuerora-Bossi. 1998. Gene transfer between related bacteria by electrotransformation. Mapping *Salmonella typhi* genes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **180**: 4750-4752.
- Van Gijsegem, F., S. Genin, y C. Boucher. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* **1**:175-180.
- Wood, M., R. Rosqvist, P. Mullan, M. Edwards, y E. Galyov. 1996. SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* **22**: 327-338.
- Wong, K-K., M. Mc Clelland, L. Stillwell, E. Sisk, S. Thurston, y J. Saffer. 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infect. Immun.* **66**: 3365-3371.
- Yabuuchi, E., M. Ikedo, y T. Ezaki. 1986. Invasiveness of *Salmonella typhi* strains in HeLa S3 monolayer cells. *Microbiol. Immunol.* **30**: 1213-1224.
- Youderian, P., P. Sugiono, K. Brewer, N.P. Higgins, y T. Elliot. 1988. Packaging the *Salmonella* chromosome with locked-in P22 prophages. *Genetics* **118**: 581-592.
- Zahrt, T., y S. Maloy. 1997. Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9786-9791.
- Zahrt, T.C., G.C. Mora, y S. Maloy. 1994. Inactivation of mismatch repair overcomes the barrier to transduction between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **176**:1527-1529.
- Zinoni, F., A. Birkmann, T. Stadman, y A. Böck. 1986. Nucleotide sequence and expression of selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4650-4654.