

UCH-FC  
DOC-B  
B639

**Factores de Virulencia de *Salmonella typhi*  
que Participan en la Resistencia  
al Macrófago Humano.**

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 en  
Microbiología.

Facultad de Ciencias

por

**Luz Pámela Blanco Palma**

Septiembre, 1996

Director de Tesis: Dr. Guido 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.

**LUZ PÁMELA BLANCO PALMA**

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 exámen de Defensa de Tesis rendido el día 30, de septiembre de 1996.

Director de Tesis:

Dr. Guido C. Mora L.



.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Carlos Jeréz



.....

Dra. María Inés Becker

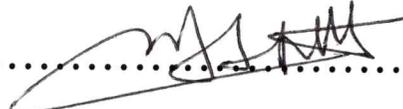
María Inés Becker

.....

Dr. James Robeson

.....

Dr. Mario Roseblant



.....



*Con todo mi cariño dedico esta Tesis a las personas que más quiero en esta vida y en este momento: mi marido e hijo, mis padres y hermanos, quienes siempre me han estimulado y apoyado, gracias por ser y estar junto a mí.*



## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de Tesis ha sido posible gracias a los aportes económicos recibidos desde: **FONDECYT** financiando el proyecto para Tesis de Doctorado (número **2930009**); Vicerrectoría Académica, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile otorgándome una beca para Tesis de Doctorado (**PG-092-94**) y **CONICYT** a través de la beca para estudiantes de doctorado que financió mis primeros cuatro años de estudios.

Quiero expresar mi más honda gratitud al Dr. Guido Mora, gracias por la valiosa amistad, orientación y enseñanza recibida. Sin duda serán importantes para continuar con buenas bases y por un buen camino haciendo ciencia. Gracias también a todos los integrantes del hermoso grupo del cual formé parte: en especial a mis amigos Dra. Inés Contreras, Cecilia Toro y Bruno Tesser, quienes siempre tuvieron buenos consejos y palabras de estímulo. Quiero destacar la valiosa cooperación que recibí de Jaime Romero, Bruno Tesser y Victor Ahumada. Gracias a José Peña y Orlando Ortiz quienes siempre tuvieron la mejor voluntad para ayudarme y para solucionar cualquier problema que se presentara en el laboratorio. Por su apoyo y estímulo quiero agradecer también al Dr. Manuel Rodríguez y a Inés Calderón. Gracias María Angélica siempre dispuesta a abrirme la puerta y darme su valiosa experiencia como secretaria. Gracias a Pedro Cortéz por su

excelente trabajo con las fotografías. Siempre recordaré también, el cariño recibido en el laboratorio del Dr. Stanley Maloy donde aprendí a conocer y disfrutar la genética bacteriana y la ciencia en general.

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE MATERIAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
1.0. CEPAS BACTERIANAS, FAGOS, PLASMIDIOS, CÉLULAS EUCARIÓTICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	21
2.0. PROCEDIMIENTOS DE ADN RECOMBINANTE.....	23
2.1. Aislamiento de plasmidios en pequeña escala.....	23
2.2. Transformaciones.....	23
3.0. ELECTROFORÉISIS E INMUNOELECTRO- TRANSFERENCIAS DE PROTEÍNAS.....	23
3.1. Preparación de extractos de proteínas periplásmicas.....	23

3.2. Preparación de proteínas de membrana externa.....	24
3.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	25
3.4. Inmunoelectrotransferencias.....	25
4.0. OBTENCIÓN DE MUTANTES <i>S. typhi</i> Ty2.....	26
4.1. Mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>TnphoA</i> .....	26
4.2. Mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>MudJ</i> .....	28
4.3. Mutante <i>S. typhi</i> Ty2 deficiente en la actividad de fosfatasa ácida.....	28
5.0. SELECCIÓN DE LAS MUTANTES <i>S. typhi</i> Ty2.....	30
5.1. Selección de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>TnphoA</i> reguladas por estrés.....	30
5.2. Selección de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>MudJ</i> desde el intracelular de las células U937.....	30
6.0. MEDICIONES DE ACTIVIDAD FOSFATASA.....	33
6.1. Actividad de fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina.....	33
6.2. Medición de actividad en cultivos expuestos al peróxido de hidrógeno.....	35
6.3. Detección de actividad fosfatasa ácida en <i>S. typhi</i> Ty2 proveniente del intracelular de células U937.....	35
7.0. DETECCIÓN DE POSIBLE(S) FOSFATASA(S) BACTERIANA(S) INDUCIDA(S) DENTRO DE LAS CÉLULAS U937.....	38

8.0. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	38
8.1. Sensibilidad a fagos.....	38
8.2. Movilidad.....	39
8.3. Auxotrofias.....	39
8.4. Regulación por estrés de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ seleccionadas desde el interior de las células U937.....	39
8.5. Determinación de la resistencia al pH ácido.....	40
8.6. Ensayo de entrada y sobrevivencia de cepas <i>S. typhi</i> Ty2 en células U937.....	40
9.0. TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA.....	43
9.1. Obtención de las cepas <i>S. typhi</i> Ty2 <i>phoP</i> .....	43
9.2. Pérdida de resistencia a tetraciclina en mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn10.....	45
9.3. Obtención de las derivadas Tn5 desde mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> .....	45
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPITULO I: Mutantes de <i>S. typhi</i> Ty2 Tn<i>phoA</i>, participación de una actividad de fosfatasa en la sobrevivencia bacteriana dentro de las células U937.....</b>	<b>48</b>
1.1. Obtención de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> .....	48
1.2. Selección de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> reguladas por estrés.....	49

1.3. Entrada y sobrevivencia de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn $\phi$ oA y derivadas Tn5 en las células U937.....	51
1.4. Inducción de una actividad de fosfatasa ácida en <i>S. typhi</i> Ty2 dentro de las células U937.....	59
1.5. Detección de la fosfatasa bacteriana inducida dentro de las células U937.....	61
<b>CAPITULO II: Mutantes de <i>S. typhi</i> Ty2 <i>phoP</i></b>	
<b>y resistencia al pH 5.....</b>	<b>65</b>
2.1. Obtención y caracterización de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>phoP</i> y A38 <i>phoP</i> .....	65
2.2. Participación de <i>phoP</i> en la regulación por peróxido de hidrógeno de la mutante <i>S. typhi</i> Ty2 Tn $\phi$ oA A38.....	66
2.3. Resistencia de cepas <i>S. typhi</i> Ty2 al pH ácido.....	66
<b>CAPITULO III: Mutantes de <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ:</b>	
<b>participación del LPS en la sobrevivencia bacteriana.....</b>	<b>70</b>
3.1. Obtención de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	70
3.2. Selección de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ desde el intracelular de las células U937.....	70
3.3. Análisis de la regulación por estrés de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	71
3.4. Resistencia al pH ácido de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>

Mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tnp <i>hoA</i> .....	78
Mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>phoP</i> .....	87
Mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	88
<b>CONCLUSIONES</b> .....	96
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	98

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas, plasmidios y fagos utilizados en esta Tesis.....	22
<b>Tabla 2:</b> Respuesta de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> a condiciones de estrés.....	50
<b>Tabla 3:</b> Características de la cepa <i>S. typhi</i> Ty2 y mutantes Tn <i>phoA</i> .....	53
<b>Tabla 4:</b> Actividad fosfatasa alcalina en cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	55
<b>Tabla 5:</b> Actividad fosfatasa ácida en cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	62
<b>Tabla 6:</b> Características de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutantes MudJ.....	72

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sistema PhoP/PhoQ en <i>Salmonella typhimurium</i> .....	11
<b>Figura 2:</b> Transposón Tn <i>phoA</i> .....	17
<b>Figura 3:</b> Transposón MudJ.....	18
<b>Figura 4:</b> Esquema de la obtención de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> .....	27
<b>Figura 5:</b> Esquema de la obtención de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	29
<b>Figura 6:</b> Esquema del análisis de la regulación frente a condiciones de estrés.....	31
<b>Figura 7:</b> Esquema de la selección de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ desde el interior de las células U937 en presencia de ampicilina.....	32
<b>Figura 8:</b> Esquema de la detección de actividad de fosfatasa ácida de <i>S. typhi</i> Ty2 proveniente del intracelular de las células U937.....	36
<b>Figura 9:</b> Esquema del ensayo de entrada y sobrevivencia de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutantes en células U937.....	42
<b>Figura 10:</b> Esquema de la obtención de las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 <i>phoP</i> mediante transducción y recombinación homóloga.....	44
<b>Figura 11:</b> Esquema de la obtención de las derivadas Tn5 desde las mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> .....	47

<b>Figura 12:</b> Índices de sobrevivencia de mutantes	
<i>S. typhi</i> Ty2 Tn <i>phoA</i> y derivadas Tn5.....	54
<b>Figura 13:</b> Curva de crecimiento para cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	56
<b>Figura 14:</b> Inmunoelectrotransferencia de extractos de cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	57
<b>Figura 15A:</b> Actividad de fosfatasa para cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	58
<b>Figura 15B:</b> Índices de sobrevivencia para cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	58
<b>Figura 16:</b> Índices de resistencia al pH 5 para cepas <i>S. typhi</i> Ty2.....	60
<b>Figura 17:</b> Inmunoelectrotransferencia de extractos de cepas <i>S. typhi</i> Ty2	
rescatadas desde el interior de las células U937.....	63
<b>Figura 18:</b> Actividad fosfatasa alcalina en mutantes A38 y A38 <i>phoP</i>	
en presencia de peróxido de hidrogeno.....	67
<b>Figura 19:</b> Resistencia al pH 5 de la cepa <i>S. typhi</i> Ty2 en función	
de la fase de crecimiento.....	68
<b>Figura 20:</b> Colonias de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutante <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ	
creciendo en agar-Luria.....	73
<b>Figura 21:</b> Resistencia al pH 5 de mutantes <i>S. typhi</i> Ty2 MudJ.....	75
<b>Figura 22:</b> Esquema de la selección de mutantes de <i>S. typhi</i> Ty2	
MudJ desde el interior de las células U937	
en presencia de ampicilina y gentamicina.....	90

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<b>A<sub>405</sub>:</b>	absorbancia a 405 nm.
<b>ADN:</b>	ácido desoxiribonucleico.
<b>Amp<sup>r</sup>:</b>	resistencia a ampicilina.
<b>bla:</b>	gen que codifica para resistencia a ampicilina.
<b>BSA:</b>	albúmina de suero de bovino.
<b>Células M:</b>	células microfoliares, ubicadas en el intestino delgado, similares a macrófagos.
<b>Células NK:</b>	células citotóxicas, <i>natural killer</i> .
<b>Células U937:</b>	línea histiocítica celular humana.
<b>DO<sub>600</sub>:</b>	densidad óptica a 600 nm.
<b>DMEM:</b>	medio Eagle modificado por Dulbecco.
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfóxido.
<b>EDTA:</b>	ácido etilendiaminotetra-acético.
<b>ELISA:</b>	ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
<b>galE:</b>	gen que codifica para una actividad epimerasa importante en la síntesis del lipopolisacárido.
<b>GKN:</b>	solución tampón fosfato salino glucosado.

<b>his:</b>	locus genético del operón histidina.
<b>IR50:</b>	secuencia de inserción derecha, componente del transposón <i>TnphoA</i> .
<b>Kan<sup>r</sup>:</b>	resistencia a kanamicina.
<b>lacZ, lacY y lacA:</b>	genes del operón lactosa.
<b>LPS:</b>	lipopolisacárido, componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.
<b>MIO:</b>	medio para evaluar movilidad bacteriana.
<b>MIP's:</b>	<i>Macrophage's induced proteins</i> .
<b>MudI:</b>	transposón con resistencia a Kan y Amp derivado del transposón Mu.
<b>MudJ:</b>	mini-transposón derivado del fago transposón mutador Mu.
<b>P22HTint:</b>	fago transductor generalizado de <i>S. typhimurium</i> , mutante hipertransductante.
<b>pag:</b>	grupo de genes inducidos por el regulador transcripcional PhoP.
<b>pagC:</b>	gen que codifica para una proteína de membrana externa de <i>S. typhimurium</i> cuya transcripción es inducida por el regulador transcripcional PhoP fosforilado.
<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino.
<b>pCH2:</b>	plasmidio de multicopias que expresa PhoA.
<b>phoA:</b>	gen de <i>Escherichia coli</i> que codifica para la enzima fosfatasa alcalina.
<b>'phoA:</b>	<i>phoA</i> truncado.

<b><i>phoN</i>:</b>	gen que codifica para una fosfatasa ácida inespecífica de <i>S. typhimurium</i> .
<b><i>phoP</i>:</b>	gen que codifica para el regulador transcripcional PhoP, que participa en la respuesta de <i>S. typhimurium</i> al macrófago murino.
<b>PhoP/PhoQ:</b>	sistema de dos componentes de <i>S. typhimurium</i> que participa en la resistencia al macrófago murino.
<b><i>pir</i>:</b>	sitio involucrado en la partición plasmidial.
<b><i>prg</i>:</b>	grupo de genes cuya transcripción es reprimida por la acción del regulador transcripcional PhoP.
<b>SDS:</b>	dodecil-laurilsulfato de sodio.
<b><i>tra</i>:</b>	gen que codifica para elementos ligados a la transferencia de plasmidios.
<b>Tet<sup>r</sup>:</b>	resistencia a tetraciclina.
<b>Tn5:</b>	transposón que codifica resistencia a kanamicina.
<b>Tn10:</b>	transposón que codifica resistencia a tetraciclina.
<b>Tn<i>phoA</i>:</b>	transposón derivado del transposón Tn5.
<b><i>trp</i>:</b>	secuencia de reconocimiento de los ribosomas proveniente del operón triptofano.
<b><i>ufc</i>:</b>	unidades formadoras de colonias.
<b>X-Gal:</b>	sustrato para b-galactosidasa, 5-bromo-4-cloro-indolil b-galatósidio.
<b>XP:</b>	sustrato para fosfatasa, 5-bromo-4cloro-indolilfosfato.

## RESUMEN

*Salmonella typhi* es un patógeno exclusivo del ser humano, agente causal de la fiebre tifoidea. El conocimiento de los mecanismos de patogenicidad y los factores de virulencia que posee esta bacteria han sido difíciles ya que no existe un modelo animal para su estudio, razón que ha complicado el desarrollo de una vacuna eficaz contra el microorganismo. Esta bacteria ha sido clasificada como un patógeno intracelular facultativo. Esta característica define a un grupo de bacterias con la propiedad de sobrevivir y de proliferar en el interior de células eucarióticas. *S. typhi* sobrevive dentro de los macrófagos humanos, para lo cual debe poseer mecanismos fisiológicos que le permitan resistir el “ataque” de los macrófagos. La hipótesis planteada en esta Tesis es que *S. typhi* expone en su superficie factores de virulencia que le otorgan la capacidad de resistir al macrófago humano. Estos factores de virulencia serían esenciales para la patogenicidad de *S. typhi* y su expresión estaría regulada por las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria en el macrófago. Estos factores pueden ser considerados de “virulencia” ya que permiten la sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos, una de las etapas esenciales para el desarrollo de la fiebre tifoidea.

La estrategia experimental consistió en la obtención de mutantes de *S. typhi* por inserción de los transposones *TnphoA* y *MudJ*. *MudJ* se inserta al azar en todo el genoma bacteriano, permitiendo la obtención de mutantes en cualquier gen del microorganismo al igual que *TnphoA* el cual además permite detectar mutaciones específicamente en proteínas bacterianas extracitoplasmáticas. Ambos transposones poseen genes indicadores de cómo ocurre la transcripción del gen afectado, lo que permite estudiar la regulación del gen mutagenizado frente a diversas condiciones ambientales. Las mutantes *TnphoA* de *S. typhi* permitieron proponer y analizar la participación de una actividad de fosfatasa bacteriana en el proceso de supervivencia dentro de las células histiocíticas humanas U937. Por otra parte, la selección de mutantes *S. typhi* *MudJ* desde el interior de las células U937 en presencia de ampicilina, sugirió una participación importante del lipopolisacárido en este proceso. Debido a la crucial participación del regulador transcripcional *PhoP* en la respuesta de *Salmonella typhimurium* dentro de macrófagos murinos, se estudió la presencia y funcionalidad de *phoP* en *S. typhi* Ty2 llevando la mutación desde *S. typhimurium* a *S. typhi* mediante transducción y recombinación homóloga. La mutante *phoP* de *S. typhi* Ty2 obtenida permitió determinar que este regulador también cumple funciones importantes en la resistencia de *S. typhi* al macrófago U937. En los tres tipos de mutantes empleados en este estudio se detectó una relación entre la capacidad para resistir el pH 5 y la capacidad de sobrevivir intracelularmente, lo que permitió sugerir que un mecanismo importante

por el cual *S. typhi* sobrevive dentro del macrófago humano es mediante la respuesta contra el pH ácido que encuentra dentro de los fagosomas.

## ABSTRACT

*Salmonella typhi* is an exclusive human pathogen that causes typhoid fever. The study of bacterial pathogenic mechanisms and virulence factors in this bacterium have been hampered by the lack of an animal model. As consequence, a vaccine has been very difficult to develop. *Salmonella typhi* has been classified as a facultative intracellular parasite because of its capacity to survive inside human macrophages. The proposed hypothesis in this Thesis is that the expression of virulence factors in the surface of the microorganism is essential for *S. typhi* pathogenesis and that the expression of these virulence factors is regulated by the environmental conditions provided by the inside of the macrophage.

The experimental approach was to obtain mutants of *S. typhi* Ty2 by insertion of the *TnphoA* and *MudJ* transposons. *TnphoA* was used to detect specifically extracytoplasmatic proteins and *MudJ*, that is able to insert anywhere in the bacterial chromosome, allowed the isolation of mutants in any bacterial gene. Both transposons carry reporter genes that allow to study the regulation of the mutated gene under different environmental conditions. The role of an acid phosphatase activity in the capacity of *S. typhi* to survive within human histiocytic cells U937 was deduced from the

characterization of the *TnphoA* mutants. The isolation of MudJ mutants resistant to ampicillin while inside U937 cells suggested an important role of the LPS in the bacterial intracellular survival process. Due to the relevant role of the transcriptional regulator PhoP in the response of *S. typhimurium* against murine macrophages, a PhoP mutant of *S. typhi* was obtained by transduction and homologous recombination and characterized. The *S. typhi phoP* mutant was unable to resist pH 5 and to survive in the U937 cells. The three types of mutants obtained in this study showed a relation between the capacity to survive inside U937 cells and to resist pH 5. These results prompted us to suggest that an important mechanism of survival expressed by *S. typhi* within human macrophages is its response against the acid pH.

## INTRODUCCIÓN

*Salmonella typhi* es una enterobacteria Gram negativa patógena exclusiva para el ser humano, agente etiológico de la fiebre tifoidea. Esta enfermedad es un problema de salud pública en Chile y en otros países en vías de desarrollo. Aunque los índices de mortalidad por fiebre tifoidea han disminuido, gracias al uso de los antibióticos, la tasa de morbilidad es alta: alrededor de 12,5 millones de casos al año, excluyendo China continental (Edelman y Levine 1986). La erradicación de esta enfermedad requiere de una vacuna eficaz, la cual aún no ha sido desarrollada.

*S. typhi* ingresa al organismo a través del agua o comidas contaminadas. Luego en el ileo distal, las bacterias se adhieren y algunas penetran a través de las células epiteliales pero fundamental y muy importante es la entrada a través de las células microfoliares o células M (Finlay y Falkow, 1989 y Salyers y Whitt, 1994). Las bacterias alcanzan la lámina propia y dentro de los macrófagos incapaces de eliminarlas, ocurre la proliferación bacteriana intracelular. Los macrófagos cargados de bacterias son drenados a los nódulos linfáticos mesentéricos y al sistema circulatorio. Ocurren bacteremias secundarias y colonización de los tejidos linfoides del bazo, hígado y médula ósea (Chatfield y col., 1992). Algunos individuos quedan como portadores crónicos, cuando

el bacilo se aloja en la vesícula biliar, lo que provoca la eliminación periódica y abundante del bacilo en las heces (Salysers y Whitt, 1994). La erradicación de este tipo de patógenos requiere de la acción lítica de células fagocíticas activadas (Kagaya y col., 1989). La activación de los macrófagos está mediada por  $\gamma$ -interferón secretado por linfocitos T de ayuda (tipo 1) y células NK y por el factor de necrosis tumoral  $\beta$  producido por los linfocitos T de ayuda (tipo 1) que han reconocido antígenos bacterianos específicos (Janeway y Travers, 1994). Los antígenos bacterianos son procesados y presentados al linfocito T sobre la superficie en las células presentadoras, asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Janeway y Travers, 1994). *S. typhi* sobrevive dentro de los macrófagos, afectando la función presentadora, limitando su rápida erradicación e impidiendo el desarrollo de la respuesta inmune celular específica.

Debido a su capacidad de sobrevivir intracelularmente en los macrófagos humanos *S. typhi* ha sido clasificada como un patógeno intracelular facultativo (Groisman y Saier, 1990 y Chatfield y col., 1992). Existen otras bacterias que también son capaces de parasitar al macrófago, por ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis* (Arsmtrong y D'Arcy Hart, 1971), *Mycobacterium leprae* (Frehel y Rastogi, 1987), *Legionella pneumophila* (Horwitz, 1983), *Ehrlichia ristici* (Wells y Rikihisa, 1988) y *Salmonella typhimurium* (Buchmeier y Heffron, 1991). Todas estas especies inhiben la formación del fagolisosoma (la fusión que ocurre entre los fagosomas y los lisosomas), y por lo tanto escapan al contacto con los componentes líticos del macrófago. Además, otras especies

como *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* escapan de los fagosomas y alcanzan el citoplasma de los macrófagos evitando el contacto con los componentes lisosomales (Farber y Peterkin, 1991; Portnoy y col., 1992; Sansonetti y col., 1986 y Falkow, 1991). Por otra parte, *Mycobacterium lepraemurium* es la única bacteria descrita capaz de sobrevivir a la acción destructiva de los componentes fagolisosomales (D'Arcy Hart y col., 1972).

Los mecanismos moleculares por los cuales estas bacterias logran sobrevivir y resistir la acción lítica de los macrófagos aún están siendo ampliamente estudiados. Pero al parecer, los componentes bacterianos presentes en la superficie cumplen un papel importante en este fenómeno. Así, en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* se inhibe la fusión del fagosoma con los lisosomas a través de elementos con propiedades antifusionantes como los sulfátidos (glicolípidos de trehalosa) y el amonio que es secretado (Gordon y col., 1980 y D'Arcy Hart y col., 1987). Los sulfátidos están ubicados en la superficie bacteriana (Goren y col., 1976). También, componentes de la superficie de *Mycobacterium leprae* participarían en la inhibición de la fusión entre los fagosomas y los lisosomas (Frehel y Rastogi, 1987). Por otra parte, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* secretan una proteína que forma poros en la membrana del fagosoma provocando su destrucción. La listeriolisina, que es la hemolisina producida por *Listeria monocytogenes*, participa en este proceso y es una proteína de estrés térmico (Sokolovic y col., 1990). Una vez en el citoplasma, estas bacterias, inducen la reorganización de la actina en estructuras muy particulares

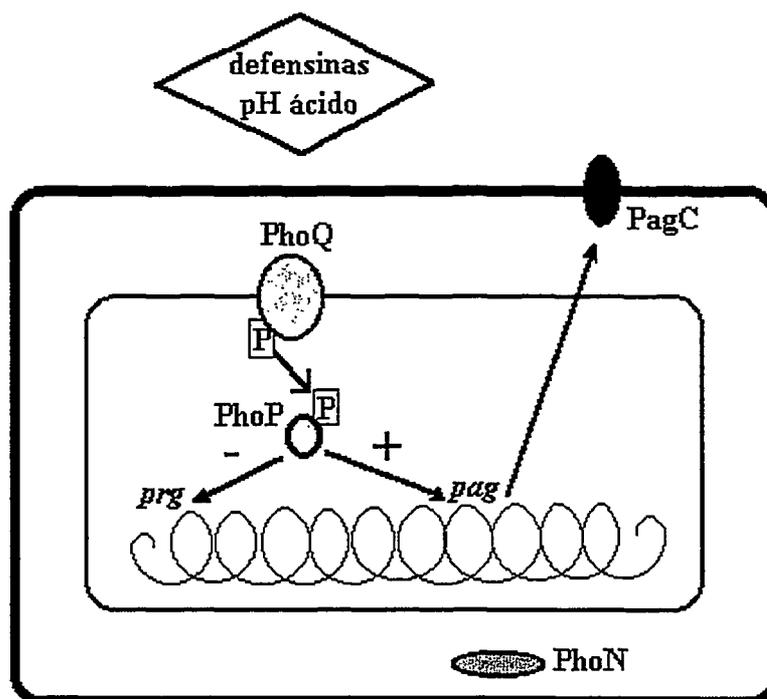
(similares a colas de cometa) a través de las cuales se desplazan para infectar a las células vecinas (Portnoy y col., 1992). El proceso de reorganización y ensamblaje del citoesqueleto celular del macrófago es fundamental para la virulencia de *L. monocytogenes* y de *S. flexneri* y participan proteínas de la superficie bacteriana (Lett y col., 1989 y Kocks y col., 1992).

Como modelo para estudiar la patogenicidad de *Salmonella* se ha utilizado *Salmonella typhimurium* que produce en el ratón una enfermedad similar a la fiebre tifoidea del ser humano. Esta bacteria es capaz de inhibir la fusión entre el fagosoma y los lisosomas de los macrófagos murinos (Buchmeier y Heffron, 1991). En este proceso inhibitorio se requiere de bacterias vivas, no hay participación del antígeno O del LPS y la bacteria modifica la expresión de ciertos genes (Buchmeier y Heffron, 1991). La modificación de la expresión génica de *S. typhimurium* es regulada cuando se encuentra dentro del macrófago murino por el sistema denominado de "dos componentes" PhoP/PhoQ (Miller y Mekalanos, 1990). La regulación génica a través de PhoP/PhoQ habilita a la bacteria para resistir al pH ácido y también a las defensinas (Miller, 1991 y Fields y col., 1989). Estas últimas son péptidos catiónicos presentes en los neutrófilos y en las células de Paneth del epitelio intestinal (Miller y col., 1990 y Belden y Miller, 1994). También, las células del epitelio intestinal y macrófagos de varios mamíferos producen péptidos catiónicos similares a las defensinas que poseen actividad antibacteriana, antiviral y fungicida (Salyers y Whitt, 1994, Belden y Miller, 1994).

PhoQ es el componente ubicado en la membrana citoplasmática de la bacteria, que transduce la señal externa detectada: la presencia de las defensinas o el pH ácido, fosforilando a PhoP (Figura 1). Luego PhoP fosforilado actúa como activador transcripcional de genes específicos (*pag*) y como represor transcripcional de otros genes (*prg*) (Groisman y col., 1989). Se ha propuesto que uno de los efectos de esta respuesta regulatoria, sería retardar la acidificación de los fagosomas, fenómeno que se observa en los macrófagos murinos infectados con *S. typhimurium* (Alpuche-Aranda y col. 1992).

El producto del gen *pagC* ha sido caracterizado como una proteína de membrana externa esencial para la sobrevivencia de *S. typhimurium* en el interior del macrófago murino (Pulkkinen y Miller, 1991). La transcripción de *pagC* es aumentada 77 veces en el interior del macrófago murino y 17 veces frente al pH ácido *in vitro* (Alpuche-Aranda y col. 1992). PagC posee homología con otras proteínas de membrana externa previamente caracterizadas: con Ail, proteína obtenida de *Yersinia enterocolitica*; con Lom expresada en *Escherichia coli* lisógenas del fago  $\lambda$  y con OmpX de *Enterobacter cloacae* (Pulkkinen y Miller, 1991). La homología de PagC con estas proteínas se encontraría en la región que se inserta en la membrana externa. Aún se desconoce cómo la presencia de PagC en la superficie bacteriana logra el efecto protector.

Otro gen cuya transcripción es inducida por el sistema PhoP/PhoQ de *S. typhimurium* es *phoN* (Figura 1), el cual codifica para una fosfatasa ácida inespecífica de tipo I (26 Kda) que se ubica en el espacio periplásmico de la bacteria (Kier y col., 1979 y Miller y col., 1989). También, el producto del gen *phoA* de *E. coli* codifica para una



**Figura 1:** Esquema del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ en *Salmonella typhimurium*. La proteína PhoQ ubicada en la membrana citoplasmática una vez que ha detectado condiciones ambientales tales como pH ácido y presencia de defensinas, presentes en los fagosomas de los macrófagos, actúa autofosforilandose en un residuo histidina y luego transfiere el grupo fosfato a PhoP en un residuo aspartato. PhoP fosforilado es activado en sus funciones de regulador transcripcional de diversos genes. Entre ellos *prg* cuya transcripción es reprimida y *pag* cuya transcripción es inducida. Además PhoP induce la expresión de la proteína PhoN, una fosfatasa ácida inespecífica de tipo I que se ubica en el espacio periplásmico de la bacteria.

fosfatasa alcalina (58 Kda) ubicada en el espacio periplásmico y cuya expresión es inducida en carencia de ciertos nutrientes (Kasahara y col., 1991). Sin embargo, en *S. typhimurium* no existe el gen *phoA*, pero la proteína PhoN reemplaza funcionalmente a PhoA ya que su expresión también es inducida en hambruna de carbono y fósforo (Kier, y col., 1979). Igualmente, en *E. coli* no existe el gen *phoN*, pero PhoA da cuenta de la actividad fosfatasa detectable a pH ácido (Kasahara y col., 1991). Además, de PhoN en *S. typhimurium* existe otra actividad de fosfatasa ácida inespecífica (tipo II) menos estudiada, que podría tener un papel en la virulencia de la bacteria y que también es regulada por el sistema PhoP/PhoQ (Galán y Curtiss, 1989). En *S. typhi* no se ha estudiado la presencia y regulación, como tampoco la función de la(s) actividad(es) de fosfatasa(s).

Existen otras proteínas expuestas al medio externo que son importantes para la virulencia de *S. typhimurium*. Estas son: una proteína de membrana externa (59 K) que participa en la protección en contra del estallido respiratorio dentro de los neutrófilos (Stinavage y col., 1990) y una proteína cuya secreción se induce a 50°C *in vitro* y que es responsable de la adherencia de la bacteria al mucus intestinal (Ensgraber y Loos, 1992).

También, una cepa de *Salmonella derby* que sobrevive dentro de macrófagos peritoneales murinos, se diferencia de otra cepa incapaz de sobrevivir, en una proteína de membrana externa de 41K (Budiarti y col., 1991).

Para resistir en el interior del macrófago murino, *S. typhimurium* expresa alrededor de 30 nuevas proteínas, las cuales han sido denominadas MIPs (*macrophage induced*

*proteins*). Algunas de éstas corresponden a proteínas que se inducen por estrés térmico y otras por el sistema PhoP/PhoQ (Buchmeier y Heffron, 1990). En otras condiciones de estrés *in vitro*, como son pH ácido, alta temperatura (42°C) y presencia de agentes oxidantes, se induce la expresión de otras proteínas, algunas específicas para cada estrés y otras comunes para todos ellos, tales como GroEL y GroES (Foster, 1991; Christman y col., 1985 y Farr y Kogoma, 1991). Estas últimas, son proteínas de estrés térmico altamente conservadas entre las especies bacterianas y también antígenos inmunodominantes para los mamíferos (Murray y Young, 1992 y Young y Elliott, 1989). La expresión de proteínas de estrés en *Yersinia enterocolitica* dentro de macrófagos murinos también ha sido detectada. La mayoría de estas proteínas se inducen también *in vitro* frente a estrés oxidativo o 42°C (Yamamoto y col., 1994).

*S. typhimurium* es atacada por especies reactivas del oxígeno aún antes de alcanzar estrecho contacto con el macrófago y esto ocasiona la modificación de la expresión génica (Francis y Gallagher, 1993); sin embargo, no se ha detectado la participación del sistema PhoP/PhoQ en esta respuesta regulatoria.

Además del estrés oxidativo (Hasset y Cohen, 1989) la capacidad bactericida del macrófago se debe fundamentalmente a: péptidos catiónicos similares a las defensinas (Leher y col., 1991 y Belden y Miller, 1994); enzimas líticas y el pH ácido que es capaz de generar (Bortolussi y col., 1987 y Ohkuma y Poole, 1978). El macrófago produce compuestos reactivos derivados de oxígeno que operan durante la interacción bacteria-macrófago (Francis y Gallagher, 1993 y Hasset y Cohen, 1989), estos son: anión

superóxido, ion hidróxilo y peróxido de hidrógeno. Este último, es considerado el agente más importante ya que puede alcanzar una concentración milimolar (Christman y col., 1985) y difundir sin descomponerse (Hasset y Cohen, 1989).

Aún se desconoce cuál es el mecanismo de resistencia a la acción lítica del macrófago humano que posee *S. typhi*. Es razonable pensar que al igual que otros patógenos facultativos intracelulares, *S. typhi* debería utilizar alguno(s) de los mecanismos que permiten sobrevivir dentro del macrófago. El único hospedero susceptible de la *S. typhi* es el ser humano (Chatfield y col., 1992), lo cual ha dificultado el estudio de la patogenicidad del bacilo, la determinación precisa de los factores de virulencia y el desarrollo de una vacuna eficaz. Por otra parte, el modelo de laboratorio ratón-*S. typhimurium* ha tenido aplicabilidad limitada en sus proyecciones para entender la tifoidea humana (Levine y col., 1983). Particularmente, se ha fracasado en los intentos de transferir mutaciones que limitan la virulencia de *S. typhimurium* en el ratón a *S. typhi* para el ser humano (Hone y col., 1988).

La estrategia utilizada para la caracterización de los factores de virulencia de agentes patógenos para el hombre, ha sido mediante la obtención de mutantes (por inserción de transposones en su genoma) que alteran la virulencia (Kehoe y col., 1981 y Fields y col., 1986). Mediante inserciones del transposón Tn10 se obtuvieron mutantes de *S. typhimurium* incapaces de sobrevivir intracelularmente dentro de los macrófagos murinos y que además fueron avirulentas para el ratón (Fields y col., 1986). La caracterización molecular de las mutantes obtenidas permitió posteriormente el hallazgo

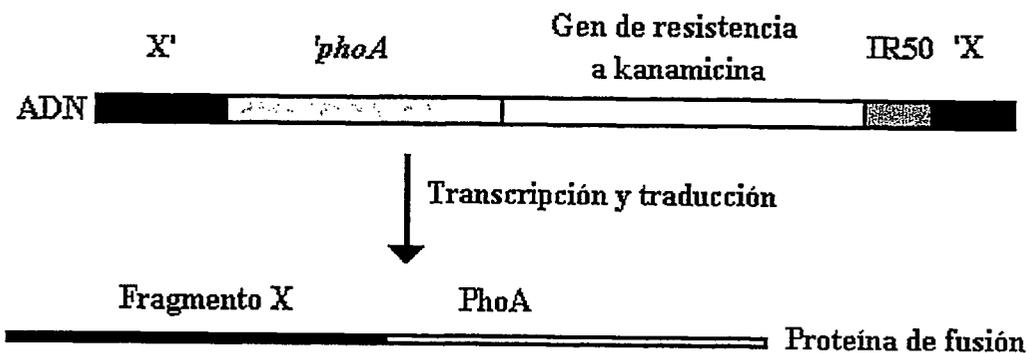
de 16 loci (*ims*) propios de *S. typhimurium* y nunca antes descritos, la mayoría de cuales mapea entre los minutos 75 y 76 del cromosoma de *S. typhimurium* (Bäumler y col., 1994).

La obtención de mutantes de *S. typhi* incapaces de sobrevivir en el intracelular del macrófago humano, presentaría varias ventajas, como la caracterización de genes determinantes de virulencia y el entendimiento de una etapa importante en el mecanismo molecular de patogenicidad empleado por *S. typhi*. Además, mutantes con estas características, pero que no pierdan su capacidad de entrar a los macrófagos podrían constituir una vacuna antitífica ideal. Desde el macrófago, una bacteria limitada en su patogenicidad o viabilidad, podría lograr inducir respuesta inmune celular indispensable para combatir infecciones de parásitos intracelulares facultativos (Kagaya y col., 1989 y Janeway y Travers, 1994). Este tipo de mutantes de patogenicidad limitada podrían emplearse como vehículos de inmunidad celular contra antígenos de otros patógenos tales como: virus, bacterias hongos y protozoos (Miller y col., 1989 y Chatfield y col., 1992).

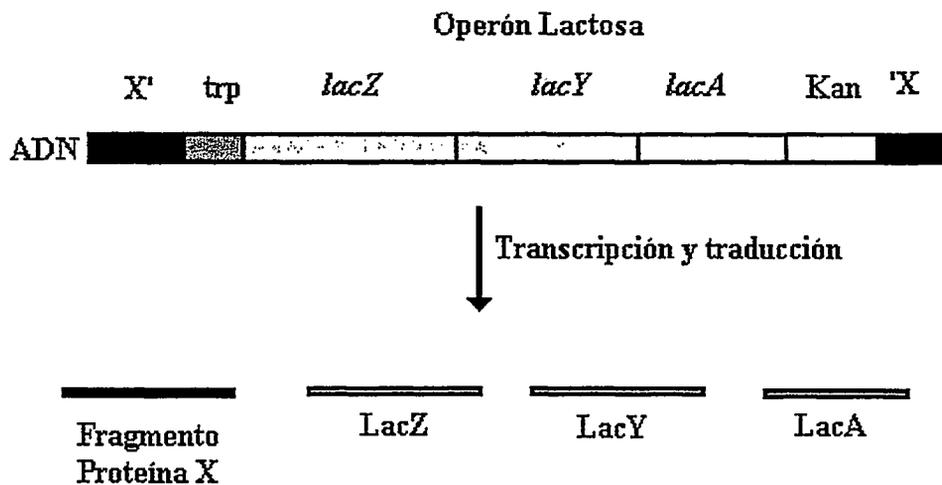
Los hallazgos recientes indican que a través de proteínas inducidas de la superficie de la bacteria, se manifiestan los mecanismos de resistencia bacteriana (Portnoy y col., 1992; Kocks y col., 1992; Pulkkinen y Miller 1991 y Miller y col., 1989). Por lo que resulta muy útil la mutagénesis con el transposón *Tn<sub>phoA</sub>*, ya que permite detectar específicamente proteínas que son exportadas a la superficie bacteriana. *Tn<sub>phoA</sub>* es un transposón derivado de *Tn5*, en el cual el gen *phoA* (fosfatasa alcalina de *Escherichia*

*coli*) reemplaza parte de la secuencia de inserción izquierda IS50L (Figura 2). La inserción de este transposón en la orientación correcta y en el marco de lectura apropiado, genera fusiones de genes entre el gen interrumpido y el gen de la fosfatasa alcalina aportado por el transposón (Manoil y Beckwith, 1985). La enzima fosfatasa alcalina sólo es activa cuando está expuesta en la superficie bacteriana (membrana citoplasmática, membrana externa y proteínas secretadas al espacio periplásmico o al exterior) ya que requiere de la formación de enlaces disulfuro intracatenarios que pueden adquirirse espontáneamente en el ambiente oxidativo vecino al exterior (Manoil y col., 1990). Por lo tanto, en presencia de un sustrato adecuado para la fosfatasa alcalina, es posible seleccionar fácilmente mutantes en genes de proteínas expuestas (Miller y col., 1989). Las mutaciones generadas por inserción del *TnphoA* son estables, con bajas frecuencias de excisión ( $10^{-8}$  en DNA cromosomal) debido a que este transposón posee un sistema de transposición limitado y estrictamente regulado (Egner y Berg, 1981).

Por otra parte, la mutagénesis con el mini-transposón MudJ produce inserciones al azar en todo el genoma bacteriano y genera fusiones de operones (Figura 3). Con este tipo de fusiones se logra el estudio del efecto sobre la transcripción que sufren los genes mutagenizados (Casadaban y Cohen, 1979). Estas mutaciones también tienen alta estabilidad ya que este mini-transposón carece de las transposasas. Así, se pueden obtener mutantes en genes reguladores y también en genes de enzimas que podrían participar en la síntesis de algún factor de virulencia importante, no proteico, que no se



**Figura 2:** Esquema del transposón *Tn<sub>phoA</sub>* insertado en un gen X. Este transposón, que deriva del transposón *Tn5*, codifica para resistencia a kanamicina y tiene reemplazada la secuencia *IR50* de *Tn5* por el gen *phoA*. Este gen, de *Escherichia coli*, codifica para una fosfatasa alcalina. Si el transposón queda insertado en la orientación y en el marco de lectura correctos, se formarán proteínas de fusión entre el fragmento del gen X y la proteína PhoA. La expresión de la proteína de fusión queda en función de la transcripción del gen X. Luego será posible detectar la actividad de fosfatasa alcalina sólo cuando la proteína de fusión atraviese la membrana citoplasmática y quede expuesta al ambiente externo de la bacteria.



**Figura 3:** Esquema del transposón MudJ insertado en un gen X. Este transposón posee las secuencias de unión de ribosomas del operón triptofano (*trp*), lo que permite que una vez ocurrida la transcripción en función del promotor del gen X, se expresen las proteínas del operón de la lactosa. Este transposón codifica para resistencia a kanamicina (Kan).

detecte con la mutagénesis mediante *TnphoA*, como por ejemplo: LPS, glicolípidos o cápsula.

La hipótesis planteada en esta Tesis es que *S. typhi* expone en su superficie (definiendo la superficie como: membrana citoplasmática, espacio periplásmico, membrana externa y medio externo) factores de virulencia que le otorgan la capacidad de resistir al macrófago humano. Los factores de virulencia serían esenciales para la patogenicidad de *S. typhi* y la expresión de éstos estaría regulada por las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria en el macrófago.

En esta Tesis se consideraran condiciones de estrés: temperatura 42°C, pH 5 y presencia de peróxido de hidrógeno en concentración no letal. Estas tres condiciones de trabajo se encuentran ampliamente usadas en estudios con *S. typhimurium*, debido a su relevancia en la interacción bacteria-macrófago. También, frente a estas tres condiciones la bacteria induce la expresión de las proteínas de estrés térmico, lo que permite clasificar a una determinada condición ambiental como condición estresante para el microorganismo (Foster, 1991; Christman y col., 1985 y Farr y Kogoma, 1991).

Los objetivos generales son identificar factores de virulencia de *S. typhi* que participen en la resistencia al macrófago humano y caracterizar los genes respectivos y además estudiar los posibles mecanismos de escape de la acción lítica de los macrófagos, que utiliza *Salmonella typhi*.

Los objetivos específicos son:

- Generar mutantes de *Salmonella typhi* mediante inserción de los transposones *TnphoA* o *MudJ*.
- Seleccionar mutantes que sean reguladas por condiciones ambientales estresantes, que imiten las del macrófago, tales como: pH ácido, presencia de agentes oxidantes y temperatura (42°C).
- Evaluar la capacidad de las mutantes seleccionadas de invadir y proliferar en macrófagos humanos.
- Caracterizar genética y bioquímicamente al menos una de las mutantes obtenidas.
- Estudiar el mecanismo de evasión a la acción lítica de los macrófagos humanos que utiliza *Salmonella typhi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.0. CEPAS BACTERIANAS, FAGOS, PLASMIDIOS, CÉLULAS EUCARIÓTICAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Las cepas bacterianas, plasmidios y fagos empleados en esta Tesis se encuentran detallados en la Tabla 1. Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido: caldo-Luria (triptona 1% Difco, Michigan, USA; extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5% de Merck, Chile SA) o en medio sólido: agar-Luria (caldo-Luria conteniendo 1,5% agar Merck, Chile SA) a 37°C, algunos cultivos se realizaron en otras condiciones y se explican donde corresponde. Las cepas bacterianas se manipularon según protocolos estándares. En el laboratorio se dispone de inóculos de cada una de ellas congelados en glicerol al 20% a -20°C. La línea celular histiocítica humana U937 (Sundström y Nilsson, 1976) donada generosamente por el Dr. Eugenio Ramírez (Instituto de Salud Pública de Chile) fue mantenida en cultivo en una incubadora a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub> y humedad controlada en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, BIOS Chile IGSA) con un 10% de suero fetal de bovino (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Esta línea celular se mantiene congelada (DMSO 10% en suero fetal de bovino) a -70°C y fue manipulada según protocolos estándares de manejo de cultivos celulares

Tabla 1. Cepas, plasmidios y fagos utilizados en esta Tesis.

Cepa, plasmidio o fago	Descripción	Fuente
<b><i>S. typhimurium</i></b>		
MST1	LT2	S. Maloy
MST1148	LT2/F' <i>lacZ</i> ::Tn5	S. Maloy
MST868	Cepa rugosa	S. Maloy
MST1063	<i>his</i> ::Mud1::MudJ	S. Maloy
MST1105	<i>galE</i>	S. Maloy
MST1106	MST1105/pCH2	Esta Tesis
MST223	<i>phoP</i> ::Tn10	S. Maloy
<b><i>S. typhi</i></b>		
Ty2	Cepa silvestre	Cepa OMS
Ty2 <i>phoN</i>	<i>phoN</i> ::Tn10 (delta Tet)	I. Contreras
Ty2 <i>phoP</i>	<i>phoP</i> ::Tn10 (delta Tet)	Esta Tesis
Ty2pCH2	Ty2/pCH2	C. Toro
MCO1	Ty2 Mud1 Mudcts MudJ	I. Contreras
<b><i>E. coli</i></b>		
EM233	SM10::l <i>pir</i> +/	S. Maloy
EM418	pRT733 ori6K <i>tra-pir</i> - pCH2	S. Maloy
<b>Plasmidio</b>		
pCH2	<i>bla</i> :: <i>phoA</i>	S. Maloy
<b>Fago</b>		
Ffm	Lisa cepas rugosas	S. Maloy
Felix O	Lisa cepas lisas	F. Cabello
P22HTint	Fago transductor	S. Maloy

(Delves, 1994). Los suplementos y antibióticos fueron agregados según los requerimientos.

## **2.0. PROCEDIMIENTOS DE ADN RECOMBINANTE.**

**2.1. Aislamiento de plasmidios en pequeña escala:** Para aislar el plasmidio pCH2 (Hoffman y Wright, 1985) desde las cepas Ty2/pCH2 y EM418 se utilizó la técnica sugerida por Maloy (Maloy, 1990).

**2.2. Transformaciones:** Las transformaciones con ADNs plasmidiales se realizaron por electroporación, según el protocolo descrito por Maloy (Maloy, 1990).

## **3.0. ELECTROFORESIS E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS.**

**3.1. Preparación de extractos de proteínas periplásmicas:** Los extractos de proteínas periplásmicas fueron preparados mediante shock osmótico (Koshland y Botstein, 1980). Brevemente, 1 ml del cultivo bacteriano con una densidad óptica de 0,2 (600 nm) fue centrifugado a 15.000 x g por 7 min y el sedimento fue resuspendido en 150 µl de

tampón frío Tris 10 mM pH 7,5 que contenía un 20% de sacarosa. Luego se añadieron 5 µl de EDTA 0,5 M pH 8 y se incubó a 4°C durante 10 min. Se centrifugó nuevamente a 4°C. El sobrenadante fue rápidamente descartado y el sedimento se resuspendió en 150 µl de H<sub>2</sub>O destilada fría. La mezcla se incubó durante 10 min en hielo, después se centrifugó, el sobrenadante fue removido y guardado como extracto de proteínas periplásmicas y el sedimento fue resuspendido en 100 µl de H<sub>2</sub>O y guardado como extracto proteico bacteriano.

**3.2. Preparación de proteínas de membrana externa:** La fracción de membrana externa bacteriana fue obtenida según Lobos y Mora (Lobos y Mora, 1991). Para ello 4,5 ml de la cepa crecida en caldo-Luria fueron centrifugados durante 5 min a 9.000 x g. El sedimento fue resuspendido en 400 µl de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 y fue sonificado (Sonic & Materials, Vibracell) en hielo 2 veces por 60 s con una pausa de 30 s en la intensidad adecuada para tubos Eppendorfs (*% duty cycle 70 y microtip limit 5*). Luego se centrifugó por 5 min a 9.000 x g, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado nuevamente a 15.000 x g durante 45 min a 4°C. El sedimento obtenido fue resuspendido en 30 µl de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8 que contenía SDS 2% y fue calentado a 100°C durante 5 min. Finalmente se agregó solución desnaturalante (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10 %; SDS 2%; b-mercaptoetanol 5% y azul de bromo fenol 0,02 %) y las muestras fueron guardadas a -20°C.

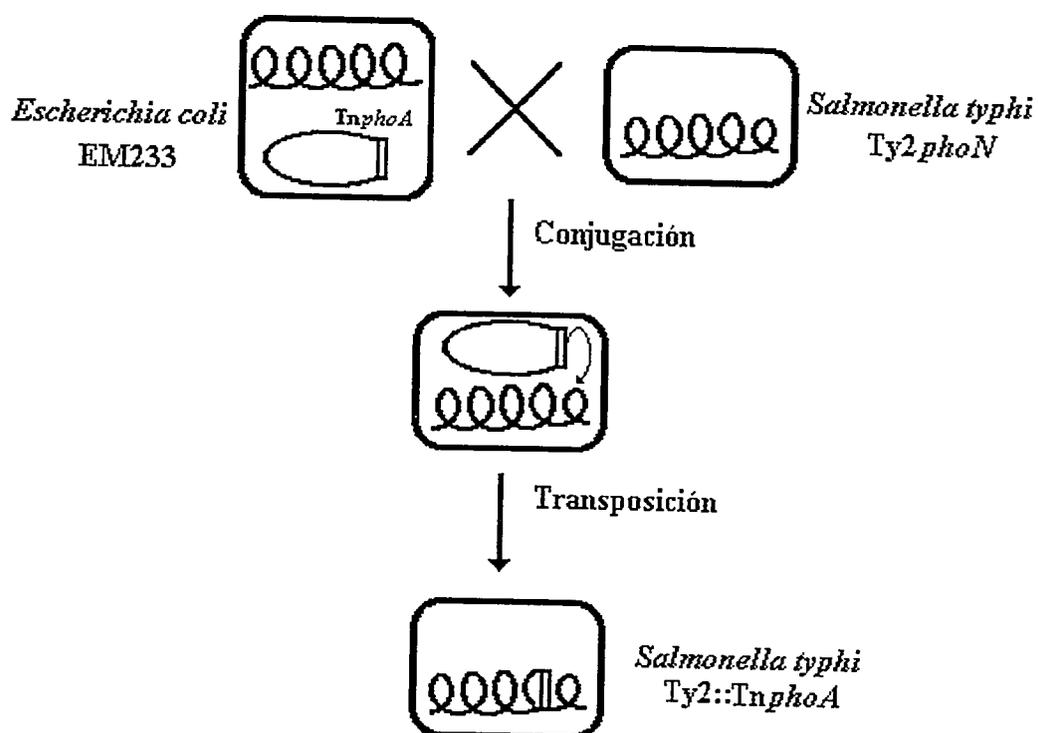
**3.3. Electroforésis de proteínas en geles de poliacrilamida:** La separación electroforética de proteínas se realizó de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970) modificado por Lobos y Mora (Lobos y Mora, 1991). En mini geles de poliacrilamida-SDS verticales con una concentración de poliacrilamida de 12,5% en el gel separador y 7% en el gel concentrador. La separación se realizó a un régimen de corriente constante de 75 mA. Los geles fueron fijados durante 15 min en solución de fijación (ácido tricloroacético 10% y alcohol isopropílico 50%), teñidos durante 12 horas en solución de tinción (ácido tricloroacético 10%; alcohol isopropílico 25% y azul de Coomassie 0,2%) y finalmente desteñidos en solución de ácido acético al 10%.

**3.4. Inmuno western blot:** Los *inmuno western blot* se realizaron basándose en el protocolo descrito por Towbin y colaboradores (Towbin y col., 1979) con las modificaciones realizadas por Toro y colaboradores (Toro y col., 1990). Después de realizada la electroforésis en geles de poliacrilamida-SDS como se describió en la sección anterior, se montó el sistema de transferencia y se transfirió a 200 mA por una hora. La nitrocelulosa fue posteriormente bloqueada incubándola en solución de tampón fosfato salino (PBS: NaCl 0,8%; KCl 0,02%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0,13% y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02%) conteniendo seroalbúmina de bovino (BSA) al 1%, durante la noche a 4°C. Luego se incubó con suero antifosfatasa alcalina disuelto 1:1000 en PBS/BSA 1% por 1 h. Este antisuero fue obtenido en nuestro laboratorio en un conejo inmunizado con la enzima purificada desde *Escherichia coli* K12 (Sigma Chem. Co.). Finalmente la

nitrocelulosa se incubó durante 1 h en suero anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chem. Co.), disuelto 1:2000 en PBS/BSA. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con agitación suave de 5 min cada uno, con PBS/Tween (Sigma Chem. Co.) 0,05%. Luego se procedió a revelar con el sustrato sal de toluidina de 4-bromo-5-cloro-indolil fosfato (0,16 mg/ml) y sal de *nitroblue tetrazolium* (0,33 mg/ml) en 5 ml de tampón sustrato (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM) incubando durante 10-20 min y luego la reacción se detuvo lavando varias veces con H<sub>2</sub>O.

#### **4.0. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *S. typhi* Ty2.**

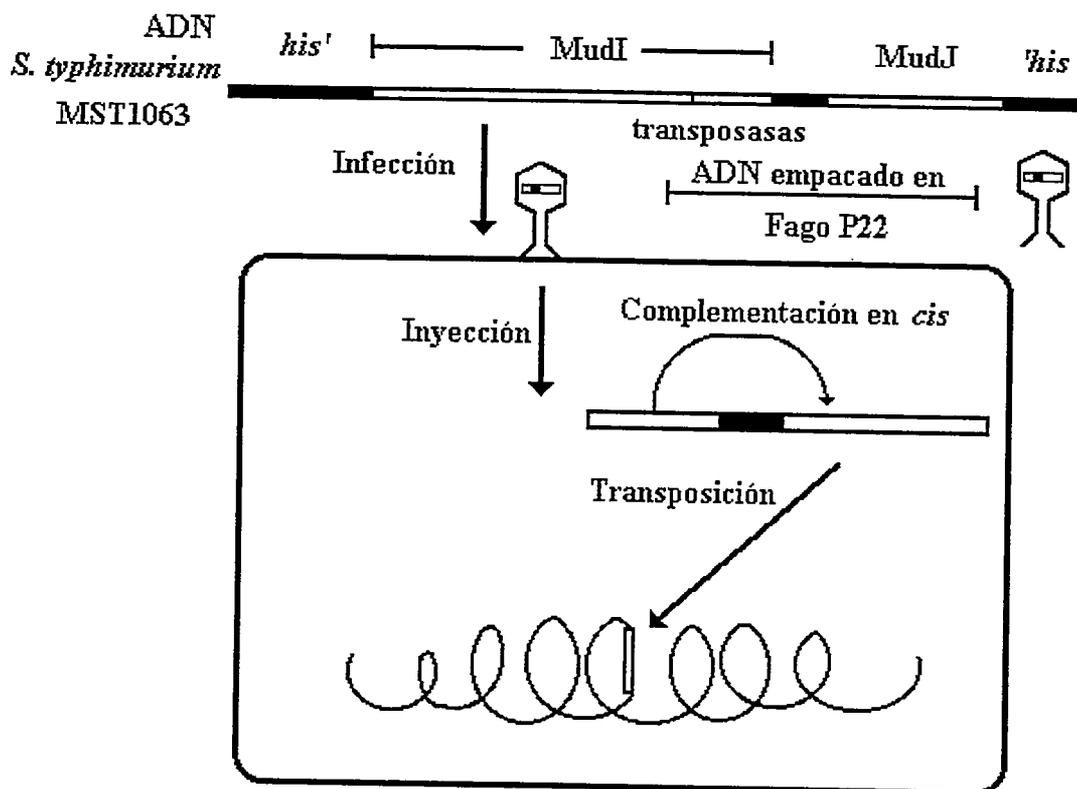
**4.1. Mutantes *TnphoA* de *S. typhi* Ty2:** Las mutantes Ty2 *TnphoA* se obtuvieron mediante conjugación entre la cepa dadora *E. coli* EM233 y la cepa receptora *S. typhi* Ty2*phoN* (Figura 4), según el protocolo descrito por Miller (1972). Las conjugantes obtenidas fueron seleccionadas en placas de agar-Luria que contenían sal sódica de 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (XP: sustrato de fosfatasa alcalina; 35 µg/ml), kanamicina (Kan; 50 µg/ml) y tetraciclina (Tet; 25 µg/ml). Para detectar aquellas mutantes que integraron el plasmidio conjugativo, se realizó una réplica en agar-Luria con ampicilina (Amp; 50 µg/ml) y todas las mutantes que resultaron Amp<sup>r</sup> fueron descartadas.



**Figura 4:** Esquema de la obtención de las mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* mediante conjugación entre las cepas EM233 y *S. typhi* Ty2 *phoN*. El transposón *TnphoA* se encuentra en el vector suicida pRT733 y la única forma de obtener cepas de *S. typhi* Ty2 con resistencia Kan y sensibilidad a Amp es mediante transposición de *TnphoA* al cromosoma bacteriano.

**4.2. Mutantes MudJ de *S. typhi* Ty2:** Las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ fueron obtenidas mediante transducción desde la cepa *S. typhimurium* MST1063 que contiene el minitransposón MudJ. Este transposón se encuentra insertado en el locus histidina junto al transposón Mud1, el cual actúa como fago ayudante (Figura 5). La transducción se realizó utilizando el fago transductor P22HT $int$  (Figura 5) como se describió previamente (Contreras y col., 1995) y las transductantes fueron seleccionadas por su resistencia a Kan y sensibilidad a Amp.

**4.3. Mutante de *S. typhi* Ty2 fosfatasa ácida deficiente:** La mutante *S. typhi* Ty2 deficiente en actividad de fosfatasa ácida fue obtenida mutagenizando la cepa de *S. typhi* Ty2 *phoN* con el transposón MudJ usando un fago inducido en la cepa de *S. typhi* MCO1 (*S. typhi* Ty2 Mud1, Muc<sup>ts</sup> y MudJ) y rescatando las transductantes resistentes a Kan y sensibles a Amp, según lo describe Contreras y colaboradores (Contreras y col., 1994). Se analizó un total de  $5 \times 10^7$  mutantes Kan<sup>r</sup> mediante replicas en placas agar-Luria a pH 5 que contenían XP y fueron seleccionadas 6 posibles mutantes de las cuales una resultó totalmente blanca o XP<sup>-</sup>.



**Figura 5:** Esquema de la obtención de las mutantes de *S. typhi* Ty2 *MudJ* mediante transducción via el fago P22HT<sub>int</sub> crecido en la cepa de *S. typhimurium* MST1063. El fago P22HT<sub>int</sub> empaqueta el DNA que contiene *MudJ* y las transposasas de *MudI*. A través de complementación en *cis* las transposasas producen la transposición de *MudJ* al cromosoma bacteriano.

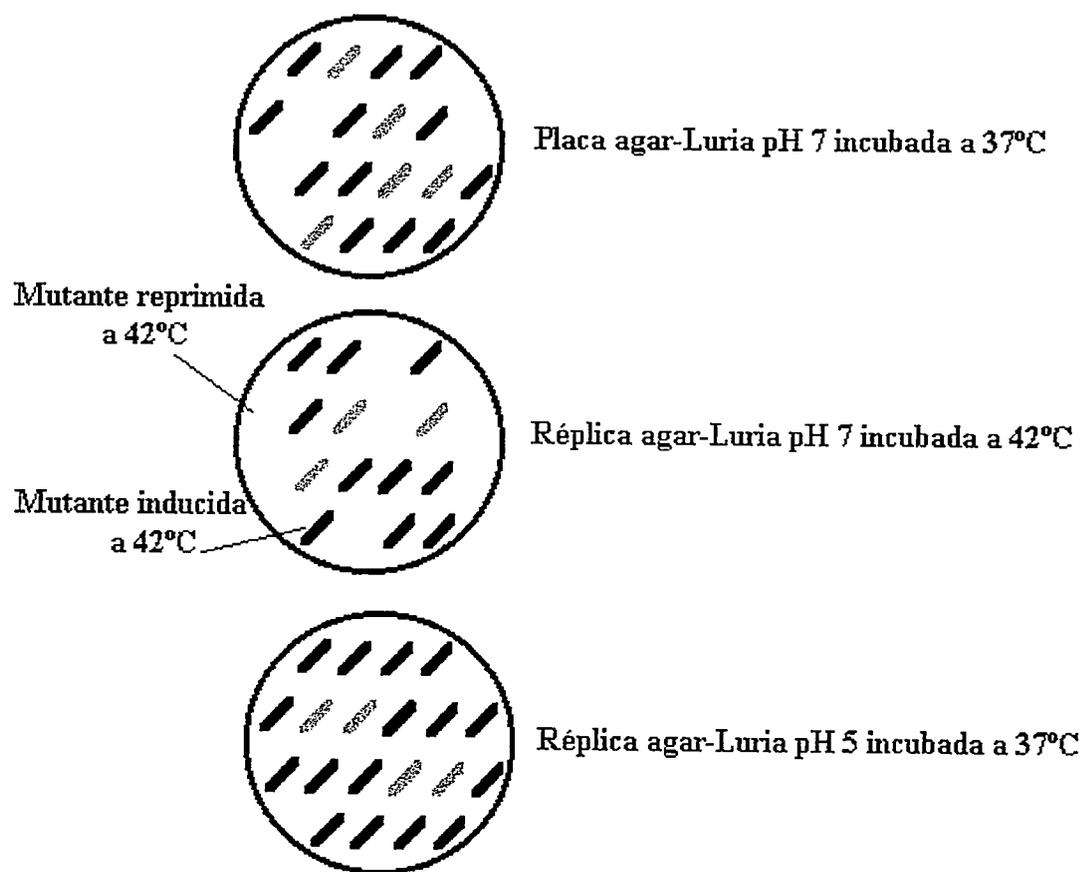
## 5.0. SELECCIÓN DE MUTANTES DE *S. typhi* Ty2.

**5.1. Selección de mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* afectadas por estrés:** Para determinar si los genes mutados eran afectados por estrés (Figura 6), se analizó el cambio de coloración dado por el indicador XP, creciendo las mutantes en agar-Luria Kan-Tet-XP a 37°C y comparando con réplicas crecidas en las siguientes condiciones:

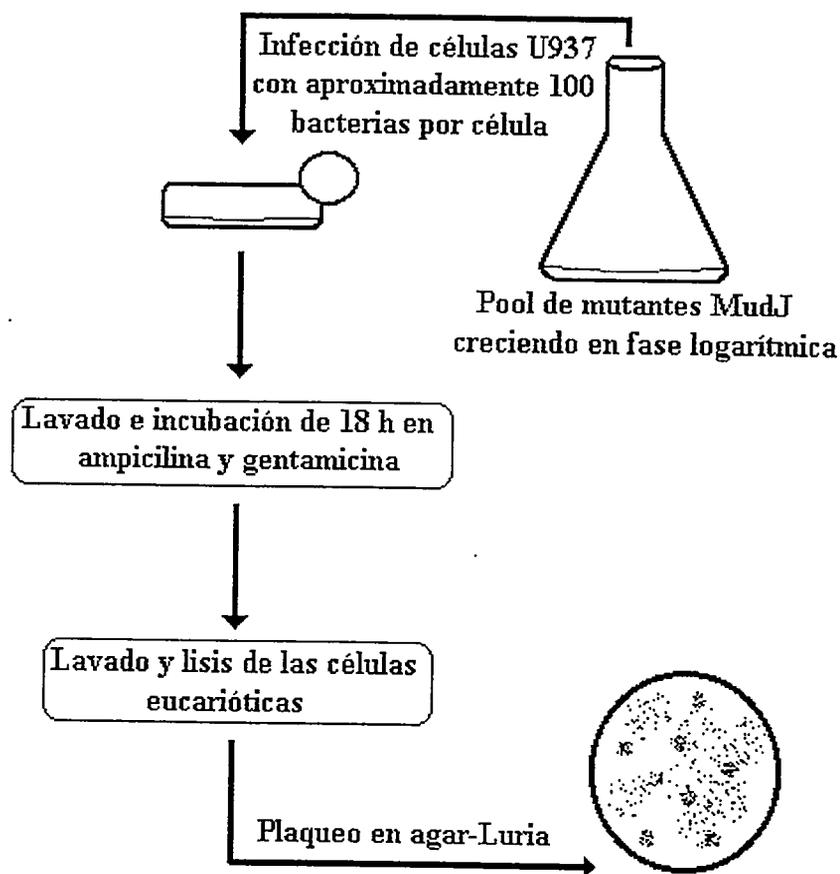
- agar-Luria XP cultivadas a 42°C.
- agar-Luria XP con peróxido de hidrógeno 120 µM, cultivadas a 37°C.
- agar-Luria XP preparado a pH 5 (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, agar 2% disueltos en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,1 M pH 5) y cultivadas a 37°C.

Todas las mutantes que presentaron modificaciones en la coloración entre estas condiciones se analizaron en el ensayo de entrada y sobrevivencia en las células U937, según se describe en la sección 8.6..

**5.2. Selección de mutantes de *S. typhi* Ty2 *MudJ* desde el espacio intracelular de las células U937:** Esta selección se realizó utilizando una mezcla de las mutantes previamente obtenidas, modificando el procedimiento descrito por Camilli y colaboradores (Camilli y col., 1989). Como se encuentra esquematizado en la Figura 7, el grupo de mutantes de *S. typhi* Ty2 *MudJ* obtenido fue mezclado y crecido hasta 0,2



**Figura 6:** Esquema de la detección de mutantes afectadas por las condiciones de estrés. La coloración del sustrato XP para fosfatasa alcalina y Xgal para  $\beta$ -galactosidasa fue comparada entre colonias que crecían en la condición estándar de cultivo y las condiciones de estrés.



**Figura 7:** Esquema del ensayo de selección de mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ desde dentro de las células U937. Las células U937 fueron infectadas con una mezcla de las mutantes y sometidas a tratamiento con los antibióticos gentamicina y Amp. De esta manera, se recuperan sólo bacterias intracelulares inmunes a la acción de Amp y con probables alteraciones en la capacidad de proliferar.

(DO 600nm) y usado para infectar la línea celular U937 en frascos de cultivo de 25 ml que contenían  $1 \times 10^6$  células en 3 ml de DMEM. Se coincubó las bacterias con las células durante 1h en una proporción de 100 a 500 bacterias por célula, luego se centrifugó en PBS a 200 x g durante 15 min para eliminar el exceso de bacterias y se resuspendieron las células en DMEM que contenía Amp 1 mg/ml y gentamicina 500  $\mu$ g/ml. Se mantuvieron las células en estas condiciones durante 20 h y luego se lisaron las células con desoxicolato de sodio 0,5% en PBS para liberar las bacterias intracelulares sobrevivientes. A estas mutantes así seleccionadas se les estudió diversas características fenotípicas. Como control se infectaron células U937 de la misma manera antes explicada con la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 y se trató con ambos antibióticos y en ausencia de Amp.

## **6.0. MEDICIONES DE ACTIVIDAD FOSFATASA.**

**6.1. Actividad de fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina:** Para medir las actividades de fosfatasa de los cultivos bacterianos se modificó el protocolo descrito por Egawa y col., (1992) adaptándolo para determinaciones micrométricas de las bacterias completas. Brevemente, 1 ml del cultivo bacteriano crecido hasta densidad óptica de 0,2 (600 nm) fue centrifugado a 15.000 x g por 7 min. El sedimento se resuspendió en solución salina (NaCl 0,85%) y nuevamente se centrifugó. El sedimento fue finalmente resuspendido en

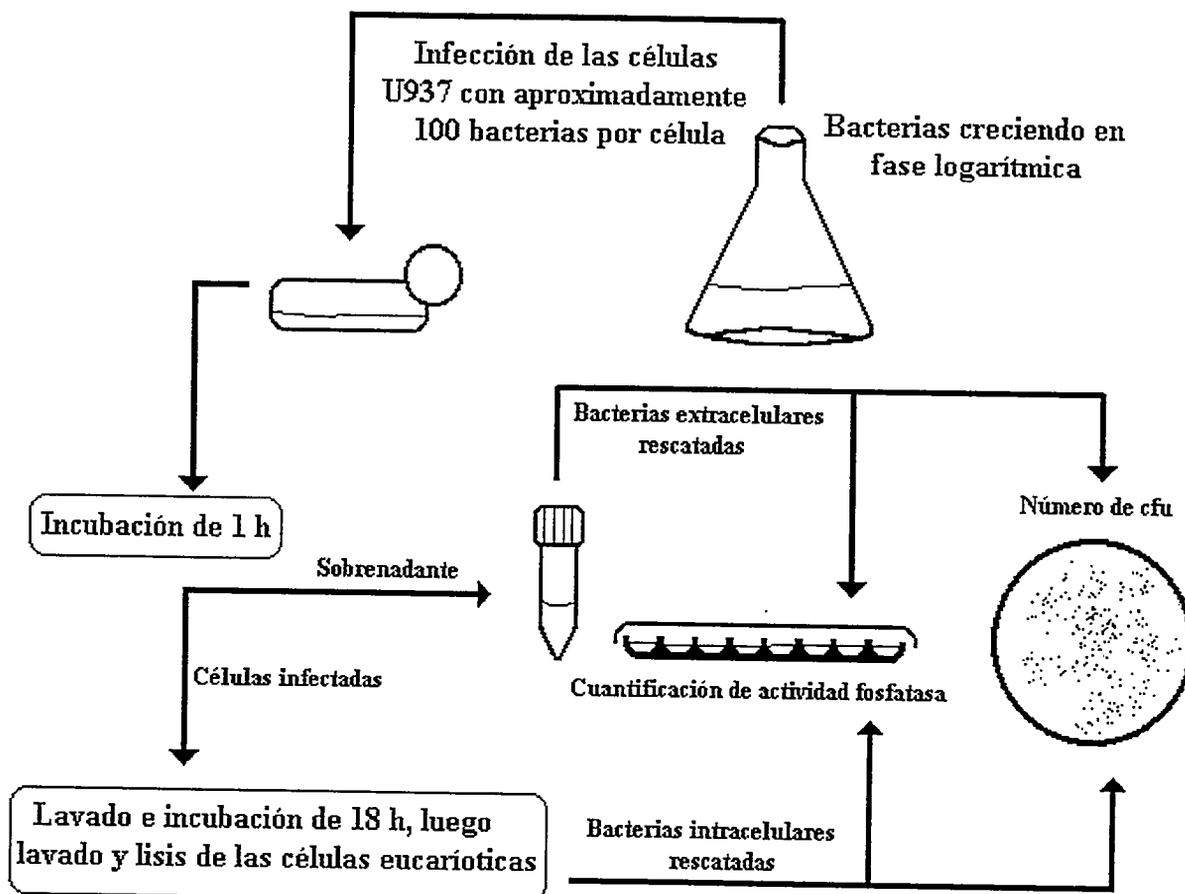
200  $\mu$ l de tampón para actividad fosfatasa ácida (ácido acético/acetato de sodio 0,2 M pH 5) o en tampón para actividad fosfatasa alcalina (Tris-HCl 1 M pH 8). Luego, 20  $\mu$ l de esta suspensión fueron alicuotados en una placa de ELISA (Dynatech Laboratories, Inc.). La reacción se inició agregando 20  $\mu$ l del sustrato p-NO<sub>2</sub>-fenilfosfato 24 mM preparado en el tampón ácido o alcalino, según correspondiera. La reacción se dejó transcurrir durante 30 min y luego fue detenida adicionando 200  $\mu$ l de una solución de carbonato de sodio 0,2 M (para la actividad de fosfatasa ácida) o 200  $\mu$ l de una solución de fosfato monoácido de potasio 1 M (para la actividad de fosfatasa alcalina). Como controles se usó cultivos bacterianos más el tampón respectivo pero sin el sustrato (para medir la absorbancia dada por el cultivo bacteriano) y solución salina más el sustrato disuelto en los tampones respectivos (para medir la integridad del sustrato). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La actividad de fosfatasa alcalina o ácida se encuentra expresada en unidades Miller modificadas según Behlau y Miller (1993), calculadas aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{A_{405} \times 1000}{DO_{600} \times v \times t}$$

En donde  $A_{405}$  representa la absorbancia medida a 405 nm (p-NO<sub>2</sub> fenolato);  $DO_{600}$  representa la densidad óptica del cultivo medida a 600 nm; v corresponde al volumen del cultivo en ml y t es el tiempo de reacción en minutos.

**6.2. Medición de actividad de fosfatasa alcalina en cultivos expuestos al peróxido de hidrógeno:** La actividad fosfatasa alcalina fue medida siguiendo el procedimiento previamente descrito sección 6.1.. El  $H_2O_2$  (Merck Chile, SA) fue adicionado a la alícuota de 1 ml del cultivo bacteriano en una concentración final de  $240 \mu M$  y ésta fue la determinación considerada tiempo cero. Se continuó la incubación a  $37^\circ C$  y luego se extrajeron dos muestras a tiempos 15 y 30 min para las determinaciones de actividad de fosfatasa alcalina. Una alícuota del cultivo permaneció en las mismas condiciones pero en ausencia de  $H_2O_2$ , todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

**6.3. Detección de actividad fosfatasa ácida en *S. typhi* Ty2 proveniente del intracelular de células U937:** Para detectar una actividad fosfatasa ácida de *S. typhi* Ty2 que sólo se expresara dentro de las células U937 se diseñó el experimento esquematizado en la Figura 8. Frascos de cultivo que contenían  $1 \times 10^6$  células U937 en 3 ml de medio DMEM, fueron infectadas con  $1 \times 10^8$  bacterias o con el mismo número de bacterias muertas por calor (incubadas 20 min a  $100^\circ C$ ), como control que permitiera medir la actividad de fosfatasa ácida propia de las células eucarióticas. Se coincubaron durante 1 h, luego se centrifugaron a  $200 \times g$  por 15 min y se resuspendieron las células en DMEM que contenía gentamicina ( $200 \mu g/ml$ ). El sobrenadante que contenía las bacterias extracelulares fue centrifugado a  $15.000 \times g$  durante 7 min, luego se lavó el sedimento en solución salina y se resuspendió en el tampón para medir la actividad de fosfatasa ácida de las bacterias extracelulares, como se describió en la sección 6.1.. Las



**Figura 8:** Esquema de la medición de actividad de fosfatasas de bacterias en contacto con las células U937. Las bacterias que estuvieron extracelulares durante 1 h fueron rescatadas y usadas para la medición de cfu y actividad de fosfatasa. Las células infectadas incubadas por 18 h en medio de cultivo, que contenía gentamicina, fueron lisadas y rescatadas las bacterias desde el intracelular para determinar cfu y actividad de fosfatasa.

células infectadas permanecieron con antibiótico durante 2 h y luego se centrifugaron para reemplazar el medio por DMEM que contenía gentamicina 100  $\mu\text{g/ml}$  (3 ml por frasco). Los frascos de cultivo que contenían células infectadas fueron incubadas durante 20 h adicionales, después las células se centrifugaron a 200 x g durante 15 min y para recuperar las bacterias intracelulares, se procedió a lisar las células eucarióticas con desoxicolato de sodio 0,5% en PBS. Las bacterias intracelulares, así obtenidas, fueron rápidamente diluidas en solución salina y centrifugadas en Eppendorf a 15.000 x g por 7 min. El sedimento fue resuspendido en 200  $\mu\text{l}$  de tampón para actividad de fosfatasa ácida y se midió la actividad de fosfatasa para las bacterias intracelulares, como se explica en la sección 6.1.. Las unidades en estos casos fueron expresadas reemplazando  $\text{DO}_{600}$  por el número de bacterias viables y sustrayendo los valores  $A_{405\text{bacterias vivas}} - A_{405\text{bacterias muertas}}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes.

#### **7.0. DETECCIÓN DE POSIBLE(S) FOSFATASA(S) BACTERIANA(S) INDUCIDAS DENTRO DE LAS CÉLULAS U937.**

Utilizando un anticuerpo antifosfatasa alcalina de *E. coli* (sección 3.4.) se detectaron proteínas que se indujeron en extractos preparados de *S. typhi* Ty2 (sección 3.1.) que estuvieron durante 20 h dentro de macrófagos U937, mediante inmunoelctrotransferencias. Para esto fue necesario realizar infecciones en gran escala.

Se utilizaron cultivos de células crecidas en frascos de 100 ml que contenían  $17 \times 10^6$  células en 10 ml de DMEM y que fueron infectadas con  $1,4 \times 10^9$  bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $DO = 0,2$  a  $600 \text{ nm}$ ). Luego de coincubar durante 1 h se centrifugó en tubos Corex a  $200 \times g$  por 15 min y desde el sobrenadante se rescató las bacterias extracelulares mediante centrifugación a  $15.000 \times g$  durante 15 min. Este precipitado fue usado para la obtención del extracto de proteínas, según se describe en la sección 3.1.. El sedimento de células fue sometido al tratamiento de antibiótico y procedimiento de lavados descritos en la sección 8.6.. Luego de las 20 h de incubación, las células U937 fueron lisadas en 1 ml de desoxicolato de sodio al 0,5% en PBS y rápidamente diluidas en 15 ml de solución salina (NaCl 0,85%). Luego por centrifugación a  $15.000 \times g$  durante 15 min en tubos Corex se obtuvo el sedimento que contenía las bacterias rescatadas desde el interior de las células U937. Este precipitado fue procesado para la obtención del extracto de proteínas según se describe en la sección 3.1.. El mismo protocolo fue seguido pero utilizando células sin infectar como control.

## **8.0. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS MUTANTES.**

**8.1. Sensibilidad a fagos:** Se estudió la sensibilidad de todas las cepas a los fagos Ffm y FelixO. Para ello, 100  $\mu\text{l}$  de cultivo en fase estacionaria se mezclaron con 3 ml de agar blando (1% triptona y 0,8% agar) a  $60^\circ\text{C}$  y se esparcieron sobre una placa de Petri que

contenía agar-Luria. Una vez gelificado el cultivo, cuidadosamente se agregaron gotas de fago de 10  $\mu$ l en diluciones en factores desde  $10^4$  hasta  $10^{12}$ , luego de incubar durante 18 h a 37°C se procedió a contar las placas de lisis producidas. Para el fago Ffm se definieron las cepas resistentes como aquellas donde no hubo formación de placas de lisis; cepas sensibles como aquellas cuyo título (número de placas de lisis x 100 x factor de dilución) fue equivalente al título obtenido con la cepa indicadora de *S. typhimurium* MST868 y como cepas semisensibles a las lisadas con un título inferior al de la cepa indicadora.

**8.2. Movilidad:** Para determinar la movilidad de las cepas bacterianas, cultivos en fase estacionaria se sembraron en tubos que contenían medio semisólido MIO (DIFCO, Detroit Michigan, USA), que permite detectar movilidad bacteriana, actividad ornitina descarboxilasa y producción de indol. Luego de incubar durante 18 h a 37°C, se analizó la coloración y opacidad del agar.

**8.3. Auxotrofías:** La auxotrofia de las cepas fue analizada realizando crecimiento en medio mínimo E ya fuera sólido o líquido y adicionando cisteína 0,3 mM y triptofano 0,1 mM, preparados según recomienda Maloy (Maloy, 1990).

**8.4. Regulación por estrés de las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ seleccionadas desde el interior de las células U937:** El análisis de la regulación por estrés de las mutantes *S.*

*typhi* Ty2 MudJ seleccionadas se realizó en forma similar a lo descrito en la sección 5.1. (Figura 6), pero sustituyendo el sustrato XP por 5-bromo 4-cloro-indolil- $\beta$ -galactósido (X-Gal) sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa codificada en el transposón MudJ.

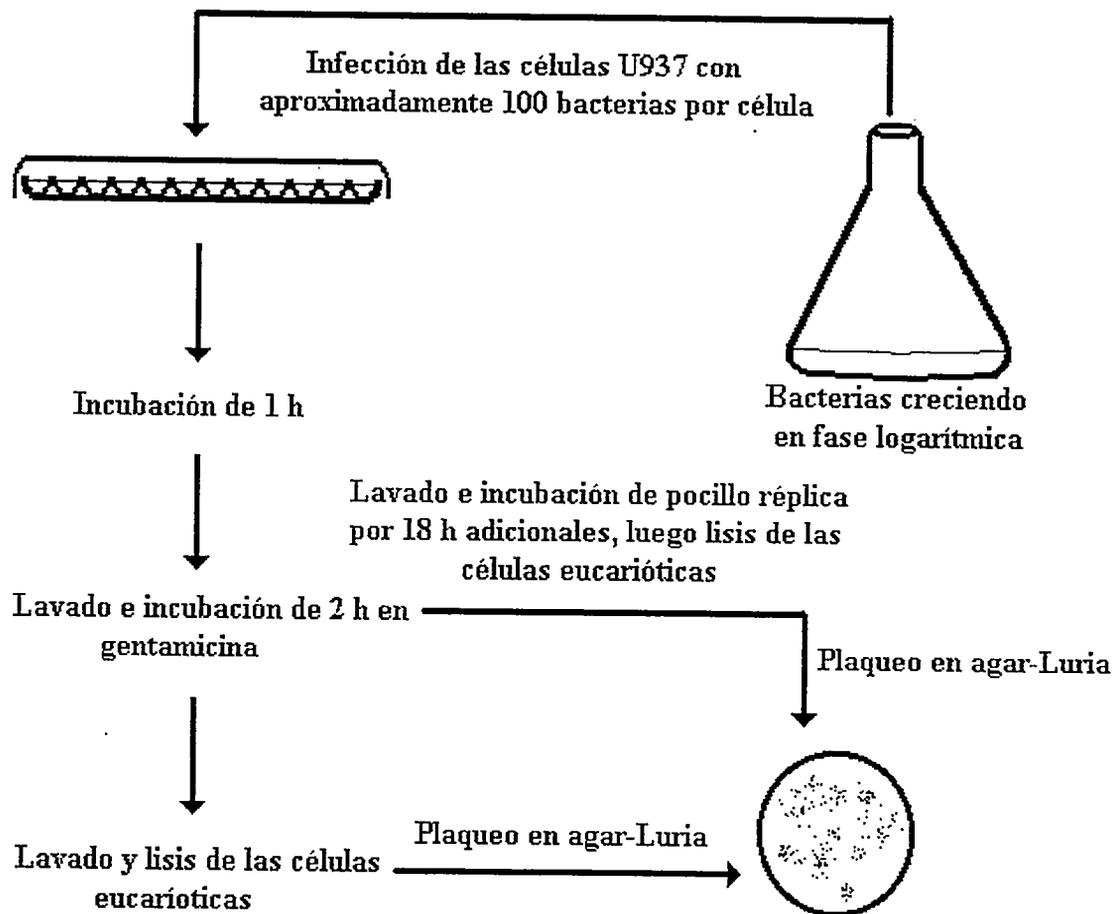
**8.5. Determinación de la resistencia al pH ácido:** Primero se determinó el índice de resistencia al pH 5,0 de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 en función de la fase de crecimiento. Esta determinación se realizó tomando alícuotas del cultivo de la cepa en caldo-Luria, las que fueron diluidas en solución salina hasta  $10^5$  y sembradas en gotas de 10  $\mu$ l sobre placas de agar-Luria preparado a pH 7 y en agar-Luria preparado a pH 5 (según se explica en la sección 5.1.). Luego de incubar las placas 18 y 42 h, respectivamente, se contó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) y se calculó el índice de resistencia al pH 5 según la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de Resistencia al pH 5} = \frac{\text{ufc pH 5}}{\text{ufc pH 7}} \times 100$$

Cada valor de ufc fue calculado promediando al menos 5 determinaciones independientes. Para el resto de las cepas en que se determinó este índice siempre se tomaron las alícuotas desde cultivos en fase logarítmica de crecimiento (densidad óptica de 0,2 a 600 nm).

**8.6. Ensayo de entrada y sobrevivencia de cepas *S. typhi* Ty2 en células U937:** Este ensayo se realizó modificando el protocolo descrito con el modelo murino (Lissner y

col., 1983). Como muestra la Figura 9, en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían aproximadamente 50.000 células por pocillo en 100  $\mu$ l de medio DMEM, se agregaron 50  $\mu$ l de los cultivos bacterianos que contenían aproximadamente  $5 \times 10^6$  bacterias crecidas hasta densidad óptica de 0,2 (600 nm) y resuspendidas en DMEM. Se coincubaron durante 1 h en incubadora a 37°C, para permitir la entrada de las bacterias. Luego se realizó un lavado llevando las células a Eppendorfs que contenían 1 ml de solución salina glucosada (GKN: NaCl 8 g/l; KCl 0,4 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,77 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0,69 g/l; glucosa 2 g/l) con gentamicina 200  $\mu$ g/ml, centrifugando 15 min a 200 x g. Luego las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM que contenía gentamicina 200  $\mu$ g/ml y se incubaron durante 2 h a 37°C, para la eliminar las bacterias extracelulares. Al finalizar esta incubación se procedió a lavar nuevamente en GKN sin antibiótico. Este ensayo se realizó en dos pocillos para cada determinación, en uno de los pocillos las células continuaron 20 h de incubación resuspendidas en DMEM que contenía 100  $\mu$ g/ml de gentamicina y las células del otro pocillo fueron inmediatamente lisadas utilizando desoxicolato de sodio al 0,5% en PBS. El lisado fue diluído en solución salina, plaqueado en agar-Luria y después de incubar 12 h se pudo determinar el número de bacterias intracelulares al tiempo definido como cero (t=0). Este valor fue utilizado para calcular el índice de entrada. El otro pocillo se trató de la misma manera concluida la incubación de 20 h y el número de ufc a t=20 permitió calcular el índice de sobrevivencia. Cada cepa fue analizada por triplicado y en cada ensayo realizado siempre se incluyeron la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 y la cepa parental de las



**Figura 9:** Esquema del ensayo de entrada y sobrevivencia de cepas de *S. typhi* dentro de las células U937.

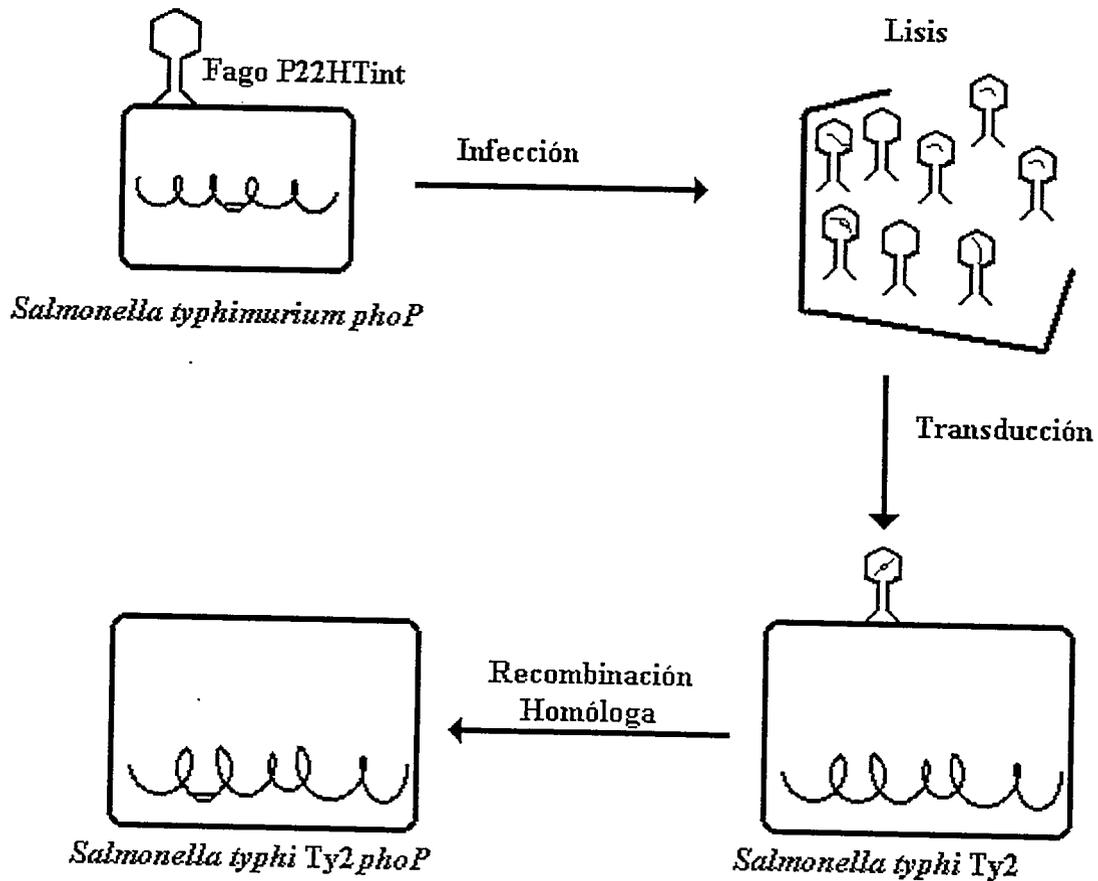
mutantes *TnphoA: Ty2phoN*. Los datos obtenidos fueron analizados según las fórmulas siguientes:

$$\text{Índice de Entrada} = \frac{(\text{ufc } t=0 \text{ mutante} / \text{ufc mutantes agregadas})}{(\text{ufc } t=0 \text{ } S. \textit{typhi} \text{ Ty2} / \text{ufc Ty2 agregadas})} \times 100$$

$$\text{Índice de Sobrevida Intracelular} = \frac{(\text{ufc } t=20 / \text{ufc } t=0 \text{ mutante})}{(\text{ufc } t=20 / \text{ufc } t=0 \text{ Ty2})} \times 100$$

## 9.0. TÉCNICAS DE GENÉTICA BACTERIANA.

**9.1. Obtención de las cepas de *S. typhi* Ty2*phoP*:** Las cepas *S. typhi* Ty2*phoP* y A38*phoP* fueron obtenidas mediante transducción vía fago P22HT*int* y recombinación homóloga (Figura 10) desde la cepa de *S. typhimurium* MST223, generosamente donada por Stanley Maloy, Department of Microbiology, University of Illinois. Esta cepa posee una inserción del transposón Tn10 en el gen *phoP*. Las transductantes fueron seleccionadas por su resistencia a Tet (10 µg/ml), posteriormente se analizó el fenotipo de las transductantes obtenidas, a saber: resistencia al pH ácido (pH 5) según se describió en la sección 8.5., actividad fosfatasa ácida y alcalina (sección 6.1.) y sobrevida dentro de las células U937 (sección 8.6).

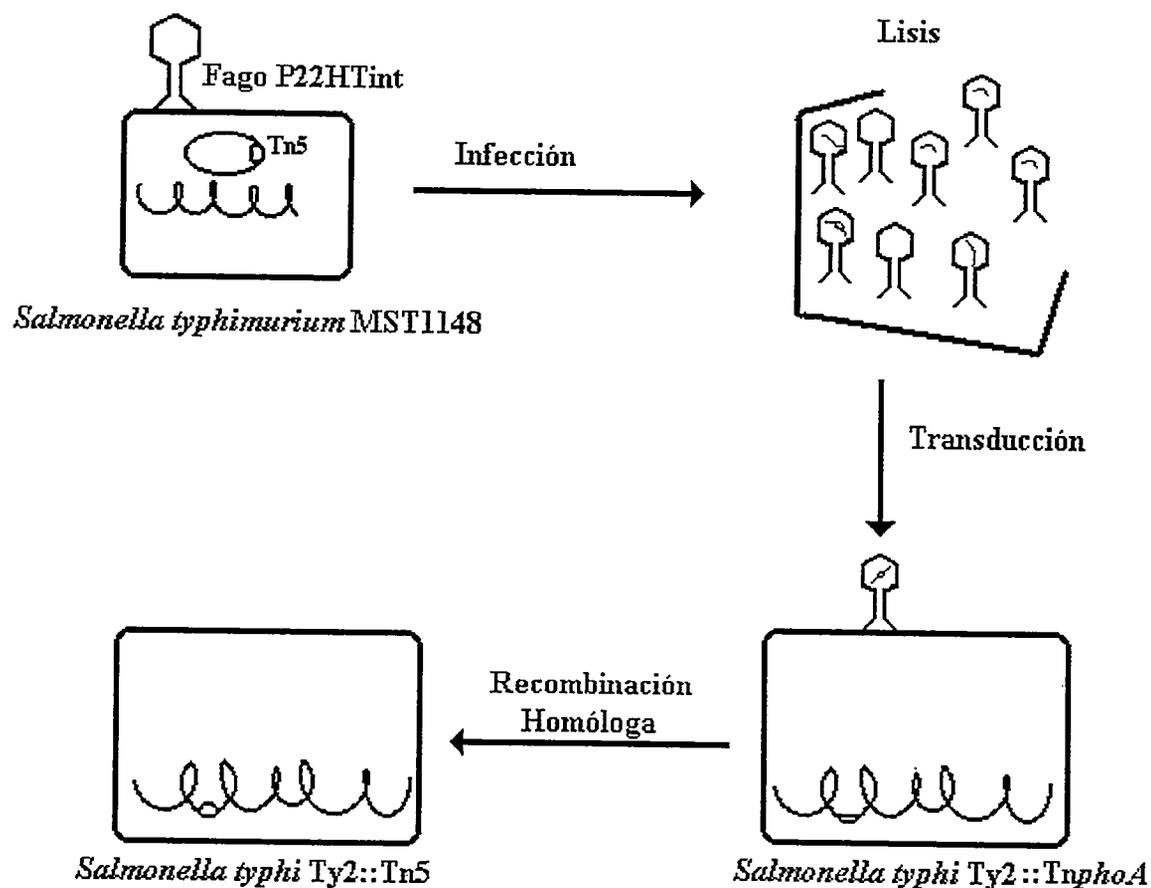


**Figura 10:** Esquema de la obtención de la mutante de *S. typhi* Ty2 $phoP$  mediante transducción via fago P22HTint y recombinación homóloga.

**9.2. Pérdida de resistencia a tetraciclina en mutantes *S. typhi* Ty2 Tn10:** La pérdida de la resistencia a tetraciclina se usó para la selección de la mutante *S. typhi* Ty2 *phoP* que recuperó el fenotipo PhoP por recombinación homóloga a través de una transducción vía fago P22HT<sub>int</sub> obtenido en la cepa silvestre de *S. typhimurium* MST1. También, fue necesaria la obtención de la mutante de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* A38 sensible a tetraciclina previo a la transducción de la mutación *phoP*. Para ello, cultivos en caldo-Luria de la mutante A38 o del producto de la transducción de la mutante *S. typhi* Ty2 *phoP* fueron sembrados en placas de medio Maloy-Bochner (Maloy y Nunn, 1981) que permiten detectar cepas que han perdido la resistencia a tetraciclina. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37°C y las colonias de mayor tamaño fueron reaisladas en este medio y luego crecidas en agar-Luria con y sin tetraciclina. Las colonias que resultaron sensibles a tetraciclina fueron usadas para la obtención de la mutante A38*phoP* como se describió en la sección 9.1 y la obtención de la revertante *S. typhi* Ty2 *phoP*<sup>+</sup>.

**9.3. Obtención de mutantes de *S. typhi* derivadas de Tn5:** Desde tres mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* fue necesario generar mutantes derivadas que perdieran la actividad de fosfatasa alcalina. Con este objetivo se transdujeron las mutantes Tn*phoA* vía P22HT<sub>int</sub>, con un lisado obtenido de la cepa de *S. typhimurium* MST1148 la cual posee el Tn5 en un plasmidio F' (Figura 11). Se seleccionaron las transductantes que perdieran el fenotipo XP<sup>+</sup> pero que conservaran la resistencia a Kan. La transducción se realizó como recomienda Maloy (Maloy, 1990), pero diluyendo 10<sup>5</sup> en solución salina el

producto de la transducción, previo al plaqueo en agar-Luria que contenía Kan y XP. Las mutantes blancas fueron aisladas y caracterizadas posteriormente en su capacidad de sobrevivir dentro de las células U937 (sección 8.6.) y su resistencia al pH ácido (sección 8.5.). En forma similar, y para ser utilizadas en experimentos controles, se mutagenizó la cepa *S. typhi* Ty2 con inserciones del transposón Tn5 llevado a través de transducción vía fago P22HT $int$  desde la cepa *S. typhimurium* MST1148. Las transposantes generadas fueron seleccionadas en placas de agar-Luria que contenían Kan.



**Figura 11:** Esquema de la obtención de las derivadas Tn5 mediante transducción via fago P22HTint y recombinación homóloga.

## RESULTADOS

### CAPITULO I:

#### Mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA*, participación de una actividad de fosfatasa en la sobrevida bacteriana dentro de las células U937.

1.1. **Obtención de mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA*:** Para obtener las mutantes de inserción del transposón *TnphoA* en *S. typhi* Ty2, la cepa *E. coli* EM233 fue conjugada con *S. typhi* Ty2 *phoN*. Esta cepa fue usada como receptora de la mutagénesis debido a que en placas de agar-Luria a pH 7, que contienen el sustrato XP, crece formando colonias blancas. De esta manera, es posible detectar aquellas bacterias que adquieran la actividad de fosfatasa alcalina otorgada por la inserción del transposón *TnphoA* y seleccionar las mutantes por su coloración celeste o azul en las condiciones antes detalladas. Del total de 56.631 conjugantes Kan<sup>r</sup>, fueron seleccionadas 869 (1,5%) colonias azules o celestes. La integración del vector suicida se detectó analizando la resistencia a Amp, de esta manera, 320 colonias Kan<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup> y Amp<sup>s</sup> fueron finalmente aisladas. Todas estas mutantes resultaron protótrofas.

**1.2. Selección de mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* reguladas por estrés:** En las mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* la expresión de la actividad de fosfatasa alcalina PhoA es indicadora de la expresión del gen mutagenizado. Por lo tanto, es posible analizar esta expresión bajo distintas condiciones de crecimiento y de esta manera detectar aquellas condiciones en que la expresión del gen experimenta modificación. La primera condición frente a la cual se estudió la regulación de las mutantes *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* fue el estrés térmico. Según se muestra en la Tabla 2, treinta y cuatro mutantes fueron consideradas como afectadas por la temperatura, de acuerdo a la modificación del fenotipo azul o celeste en placas que contenían el indicador XP entre las temperaturas de 37°C y 42°C. De estas 34 mutantes, 12 fueron clasificadas como inducidas ya que a 37°C crecían celestes y a 42°C crecían azules y 22 como reprimidas (aquellas azules a 37°C que crecían celestes o blancas a 42°C).

El peróxido de hidrógeno, 120 µM en placas de agar-Luria que contenían XP, fue empleado para seleccionar fusiones afectadas por una condición oxidativa análoga a la producida por el macrófago. De esta manera, 8 mutantes fueron consideradas como inducidas, de las cuales 4 resultaron también reguladas por la temperatura (Tabla 2) y 4 mutantes se encontraron reguladas exclusivamente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Debido a que el pH ácido es una condición fuertemente antimicrobiana dentro de los macrófagos, la respuesta frente al pH 5 de todas las mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* (320) fue ensayada en placas agar-Luria XP preparadas a pH 5. En esta condición todas las cepas incluso la cepa nativa de *S. typhi* Ty2 y la cepa parental *S. typhi* Ty2*phoN*

Cepas	Condición de estrés		
	Temperatura	H2O2	pH 5,0
Ty2	-	-	-
Ty2 <i>phoN</i>	-	-	-
A93	↑	-	-
O65	-	↑	-
C67	↑	-	-
C27	↓	↑	NC
A38	↓	↑	-
A82	↓	↑	-
A52	↓	-	CP
C70	↑	-	-
A72	↓	-	NC
A18	↓	-	-
OA11	↓	-	CP
OA14	↓	-	-
264	-	↑	-
A69	↓	-	-
A90	↓	-	-
A15	↓	-	-
O55	↑	-	-
A48	↓	-	CP
A79	↓	-	-
C29	↓	-	-
A36	↑	-	NC
C50	↑	-	CP
O40	↓	-	-
C4	↑	-	-
C64	↑	-	-
TC4	-	↑	NC
OC6	↓	-	-
A44	-	-	NC
A23	↓	-	-
C60	↓	-	-
A88	-	-	CP
C72	↑	-	-
O39	↑	↑	-
OA1	↓	-	-
A65	↓	-	-
OA5	↑	-	-
O41	↓	-	-
O53	-	↑	-
C79	↑	-	CP
A53	↓	-	-

En regulación frente al estrés ↑: indica aumento en la intensidad del azul con respecto a la condición estándar de cultivo (agar-Luria pH 7 a 37°C). ↓: disminución del azul en la condición de estrés con respecto a la condición estándar de cultivo. NC: no crece. CP: crece poco, -: no responde en la condición de estrés analizada. En el primer grupo de mutantes están aquellas con alta sobrevida, en el segundo tienen sobrevida similar a la cepa silvestre y en el tercero tienen bajos índices de sobrevida dentro de las células U937.

generaron un intenso color azul. Esto probablemente debido a actividad(es) de fosfatasa ácida aún no caracterizada(s) y distinta(s) de PhoN. Aún así, fue posible detectar 11 mutantes *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* que fueron incapaces de crecer o crecieron pobremente en placas de agar-Luria a pH 5 (Tabla 2). Ocho de estas mutantes resultaron reguladas también por la temperatura y la mutante C27 presentó regulación por la temperatura y además por la condición oxidativa (Tabla 2).

**1.3. Entrada y sobrevivencia de mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* y derivadas de Tn5 en las células U937:** El papel de los genes regulados por el estrés en la interacción de cada mutante con los macrófagos, fue analizado a través de la habilidad de las mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* de entrar y sobrevivir dentro de las células U937 (Tabla 3). Los índices de entrada y de sobrevivencia para la cepa parental receptora de la mutagénesis por inserción del transposón Tn*phoA*, *S. typhi* Ty2*phoN*, fueron similares a los observados para la cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Tabla 3). Sin embargo, el 50% (20 mutantes) de las mutantes evaluadas exhibieron una mejor capacidad para sobrevivir intracelularmente (índice de sobrevivencia  $\geq 200$ ) que la cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Tabla 3). Para determinar si la capacidad aumentada de sobrevivir dentro de las células U937 se debía a la actividad de fosfatasa alcalina aportada por el transposón o exclusivamente a la mutación causada por la inserción del transposón Tn*phoA*, 3 mutantes Tn*phoA* de *S. typhi* Ty2, elegidas al azar, fueron mutagenizadas con Tn5 vía fago P22HT*int*. Las mutantes Tn5 que perdieron la actividad fosfatasa alcalina, drásticamente disminuyeron los índices de sobrevivencia

comparadas con las mutantes *TnphoA* parentales, respectivas (Figura 12 y Tabla 4) recuperando niveles similares a los de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2.

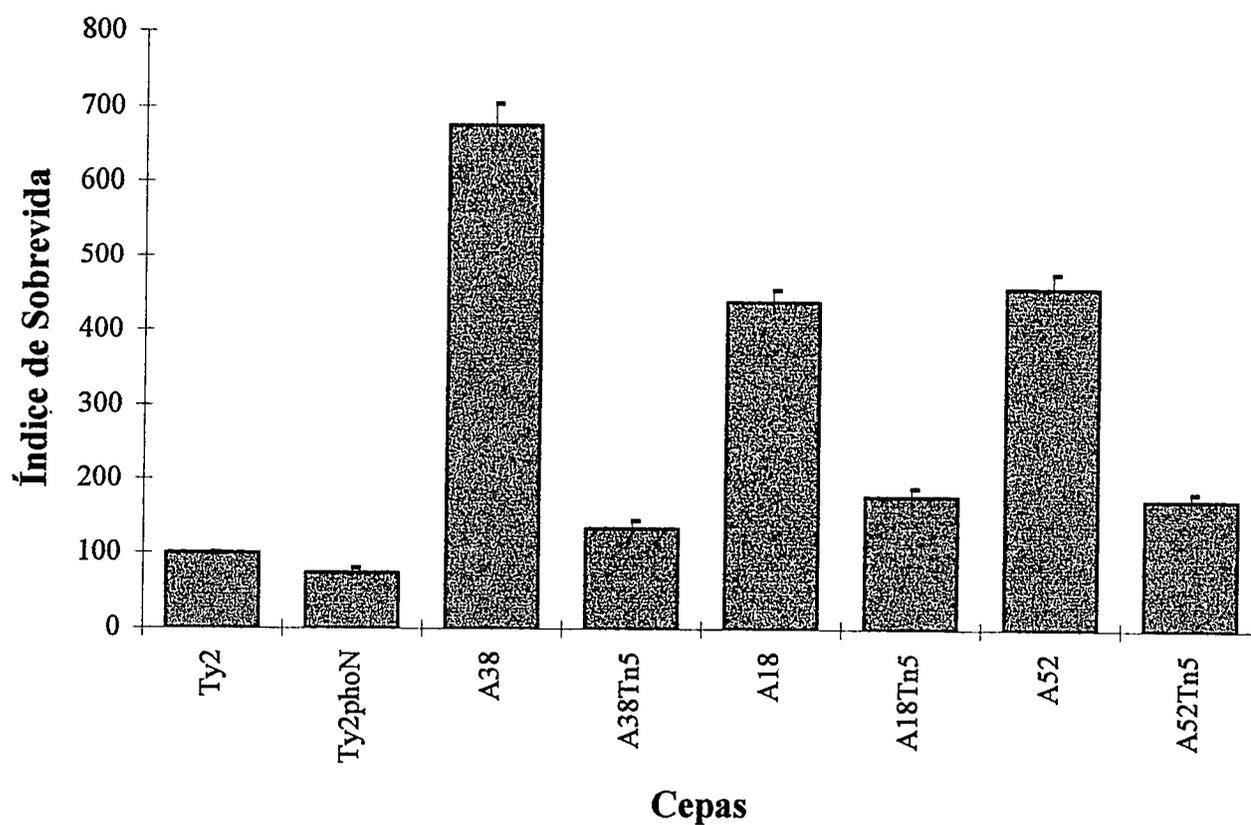
Otra explicación alternativa es que la presencia del transposón *TnphoA* le otorgue una ventaja en el crecimiento a la bacteria. Esto fue evaluado mediante una curva de crecimiento para las cepas *S. typhi* Ty2 y las mutantes A38 y derivada A38Tn5. Como se aprecia en la Figura 13, la mutante A38 que presenta índices de sobrevivencia superiores a la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (Figura 12 y Tabla 4) es la que más tarda en alcanzar la fase logarítmica. Contrariamente, la mutante A38Tn5 alcanza la fase logarítmica al mismo tiempo que la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (Figura 13) indicando que la presencia del transposón Tn5 no es deletérea para la mutante A38.

Para estudiar mejor el posible papel de una actividad de fosfatasa alcalina, codificada en el transposón *TnphoA*, en el proceso de resistencia de las mutantes al macrófago, se obtuvo una cepa de *S. typhi* Ty2 (Ty2pCH2) transformada con el plasmidio de multicopias pCH2 el cual codifica para el gen *phoA* y expresa una alta actividad fosfatasa alcalina. En esta cepa se comprobó, mediante inmuno *western blot* de extractos obtenidos a través de *shock* osmótico de la cepa Ty2 pCH2, la correcta ubicación de la proteína PhoA (58 Kda) en el contenido del espacio periplásmico bacteriano (Figura 14, carril 3). A pesar de que esta cepa expresa una alta actividad de fosfatasa alcalina (Figura 15A y Tabla 4), se observó una baja capacidad de sobrevivir intracelularmente en las células U937 (Figura 15B) y una alta sensibilidad al pH ácido

Tabla 3. Características de la cepa *S. typhi* Ty2 y mutantes *TnphoA*.

Cepas	Indice de		Sensibilidad Fago Ffm	Movilidad
	Entrada	Sobrevida		
Ty2	100	100	R	+
Ty2 <i>phoN</i>	90 ± 9 (n=11)	74 ± 8 (n=11)	R	+
A93	68	1044	Semi-S	+
O65	50	972	Semi-S	+
C67	55	937	R	+
C27	18	882	R	ND
A38	121 ± 16 (n=6)	676 ± 29 (n=6)	Semi-S	+
A82	16 ± 4 (n=5)	662 ± 27 (n=5)	Semi-S	+
A52	7	564	Semi-S	+
C70	30	519	Semi-S	+
A72	9	468	S	-
A18	95 ± 10 (n=6)	439 ± 16 (n=6)	Semi-S	+
OA11	48	389	R	+
OA14	10 ± 1 (n=3)	361 ± 13 (n=3)	R	ND
264	8 ± 2 (n=6)	326 ± 21 (n=6)	Semi-S	+
A69	75 ± 9 (n=3)	311 ± 19 (n=3)	Semi-S	ND
A90	31 ± 4 (n=3)	248 ± 17 (n=3)	Semi-S	+
A15	28	247	Semi-S	+
O55	78 ± 7 (n=3)	231 ± 16 (n=3)	R	+
A48	94	220	R	+
A79	34	206	Semi-S	ND
C29	52	200	Semi-S	+
A36	69	183	Semi-S	+
C50	24	177	Semi-S	+
O40	158 ± 16 (n=3)	176 ± 15 (n=3)	R	+
C4	112	121	R	ND
C64	32 ± 5 (n=3)	116 ± 8 (n=3)	Semi-S	+
TC4	43 ± 5 (n=3)	87 ± 9 (n=3)	S	+
OC6	17 ± 4 (n=3)	84 ± 9 (n=3)	R	ND
A44	18	76	Semi-S	+
A23	19	66	Semi-S	ND
C60	118	58	R	+
A88	107	46	Semi-S	ND
C72	8	45	Semi-S	+
O39	29	35	Semi-S	+
OA1	18 ± 3 (n=3)	34 ± 6 (n=3)	R	+
A65	109	18	R	+
OA5	6	17	Semi-S	+
O41	198	16	Semi-S	ND
O53	5	16	S	+
C79	1	4	Semi-S	+
A53	6 ± 1 (n=4)	1 ± 1 (n=4)	Semi-S	+

En las determinaciones de la sensibilidad al fago Ffm se usó la cepa MST868 de *S. typhimurium* como referencia, según se explica en Materiales y Métodos. R: resistente o lisa Semi-S: semiresistente o semirugosa y S: sensible o rugosa. En movilidad +: móvil; -: inmóvil y ND: no determinado. Valores promedio ± error estadístico; n: indica el número de determinaciones promediadas. El resto corresponde al promedio de dos ensayos con resultados similares.



**Figura 12:** Índices de sobrevida para mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* y sus respectivas derivadas Tn5. Valores promedio  $\pm$  error estadístico de al menos tres determinaciones.

**Tabla 4.** Actividad fosfatasa alcalina en cepas de *S. typhi* Ty2.

Cepas	Indice de Sobrevida	Actividad de Fosfatasa Alcalina	
		Unidades Miller	Porcentaje
Ty2	100	54 ± 12 (n=3)	100
Ty2 <i>phoN</i>	74 ± 8 (n=11)	31 (n=2)	57
Ty2pCH2	4 ± 1 (n=3)	7837 ± 526 (n=3)	14.513
A38	676 ± 29 (n=6)	91 ± 27 (n=3)	169
A38Tn5	134 ± 10 (n=5)	27 ± 2 (n= 3)	50
A38Tn5pCH2	31 ± 4 (n=4)	9164 ± 662 (n=3)	16970

Valores promedio ± error estadístico de al menos 3 determinaciones; n: indica el número de determinaciones realizadas.

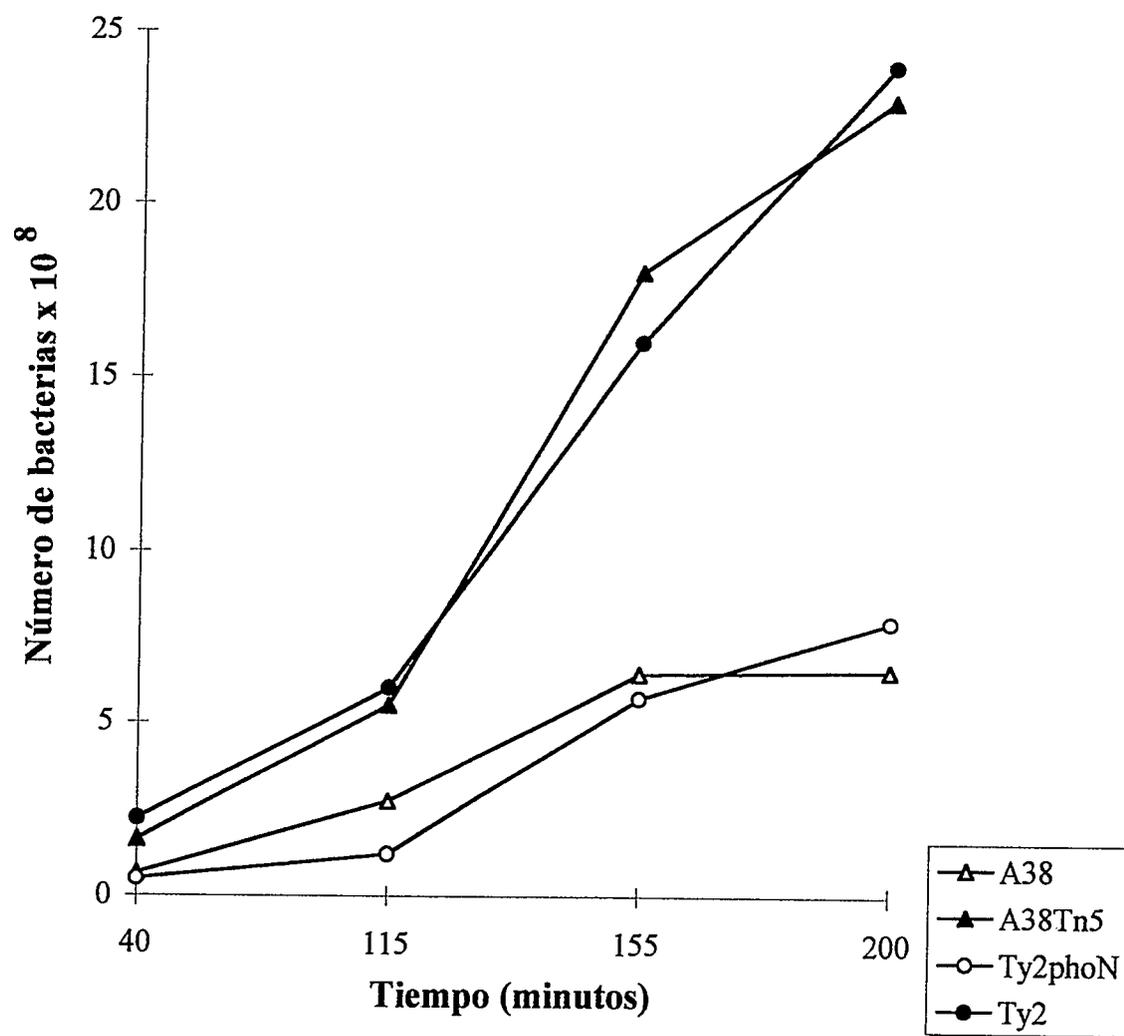
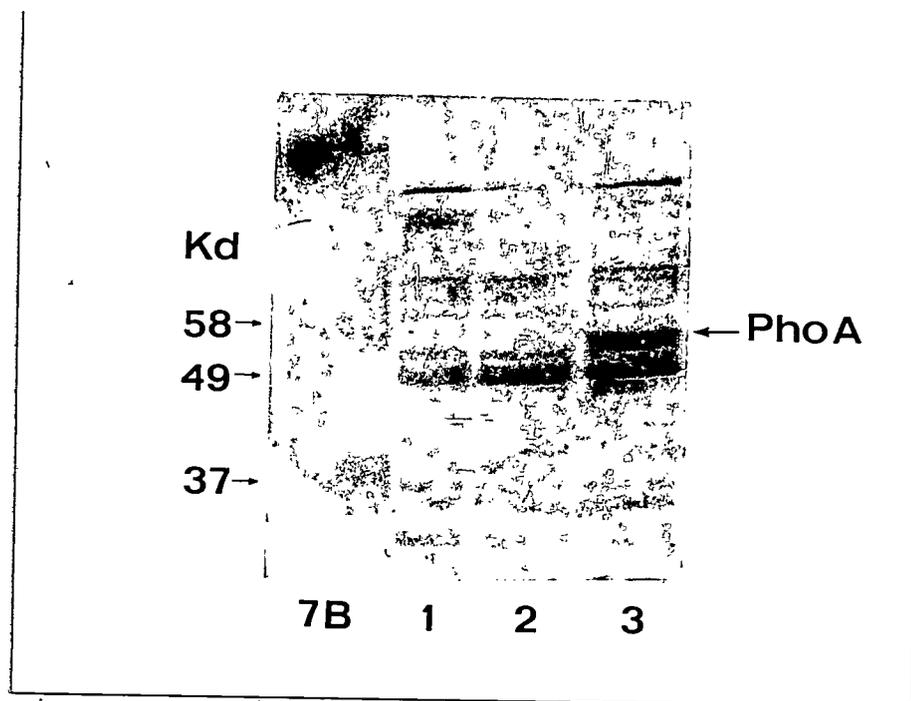
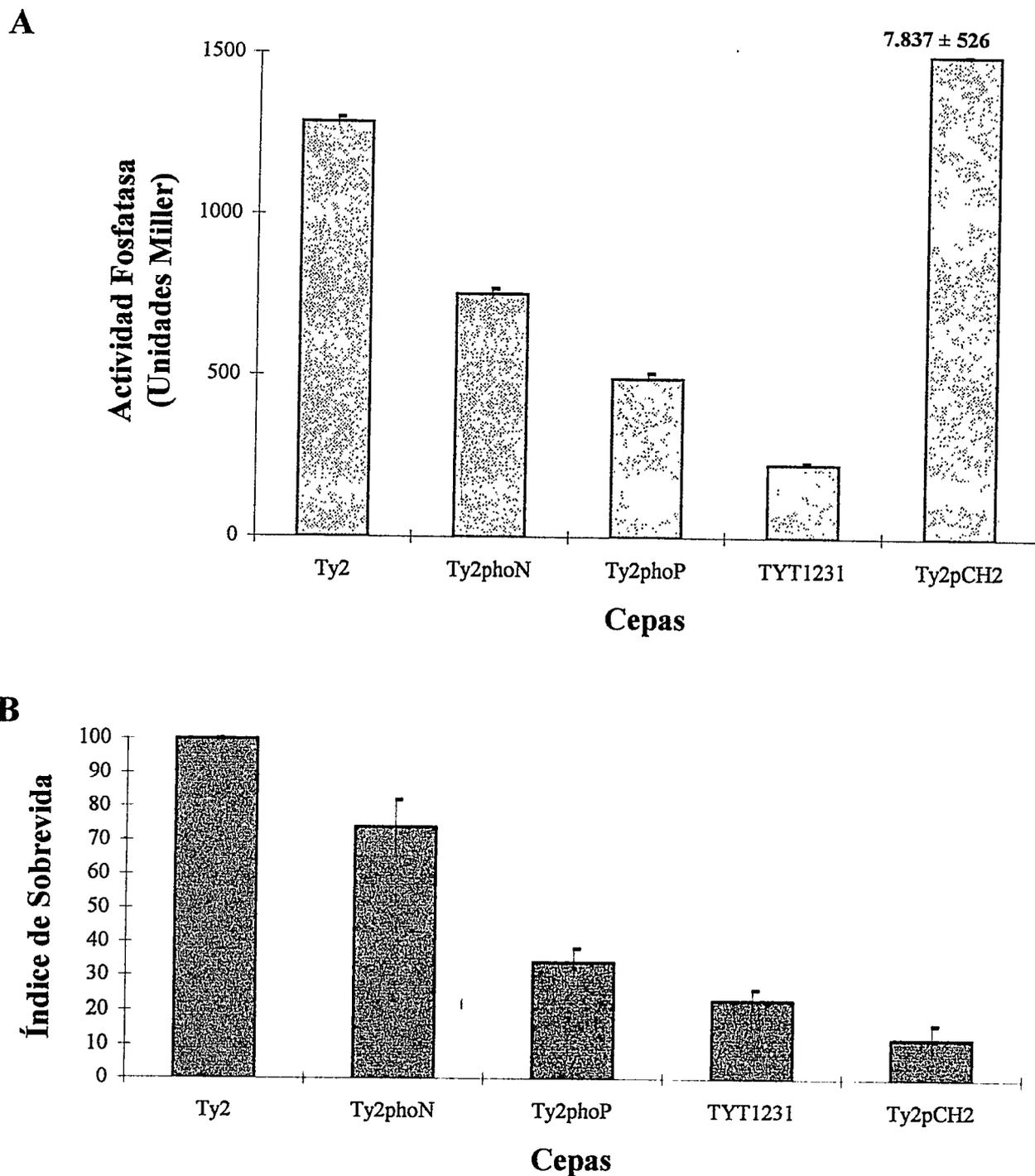


Figura 13: Curvas de crecimiento para la cepa *S. typhi* Ty2 y mutantes A38, A38Tn5 y *S. typhi* Ty2phoN. Los cultivos se realizaron en caldo-Luria, a 37°C, con agitación.



**Figura 14:** Inmunoelectrotransferencia de extractos bacterianos obtenidos por *shock* osmótico y revelados con un anticuerpo anti fosfatasa alcalina de *E. coli*. Carril 1: *S. typhi* Ty2; carril 2: *S. typhi* Ty2*phoN*; carril 3: *S. typhi* Ty2pCH2. 7B: corresponde a los estándares de peso molecular preteñidos.



**Figura 15:** A) Actividad de fosfatasa ácida para las cepas *S. typhi* Ty2, *S. typhi* Ty2phoN, *S. typhi* Ty2phoP y TYT1231. Actividad de fosfatasa alcalina para la cepa *S. typhi* Ty2pCH2. Ambas medidas en unidades Miller como se explica en materiales y métodos. B) Índices de sobrevida para cepas de *S. typhi* Ty2. Valores promedio  $\pm$  error estadístico de al menos tres determinaciones.

(Figura 16) con respecto a la cepa nativa *S. typhi* Ty2. Al parecer, la cantidad de proteína PhoA expresada en esta cepa es excesiva y deletérea para la bacteria.

Por otra parte, la mutante TYT1231 obtenida mediante la inserción del transposón MudJ en la cepa *S. typhi* Ty2 *phoN* y seleccionada por la pérdida de actividad de fosfatasa ácida a pH 5 (Figura 15A) generó dentro de las células U937 un índice de sobrevivencia bastante bajo (Figura 15B), a pesar de que su índice de entrada fue similar al de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (dato no mostrado). Esta mutante tiene un bajo índice de resistencia al pH 5, lo que es muy importante porque está de acuerdo con la hipótesis planteada en esta Tesis de que la expresión de este gen que otorga actividad de fosfatasa ácida, es inducido a pH 5. En pH 7 la mutante TYT1231 crece celeste en presencia del sustrato X-Gal; en cambio a pH 5 la colonia es azul (dato no mostrado). Este resultado apoya la hipótesis de que una actividad de fosfatasa que funciona a pH ácido en *S. typhi* cumple un papel importante en el fenómeno de sobrevivencia dentro de las células U937.

**1.4. Inducción de una actividad de fosfatasa ácida en *S. typhi* Ty2 dentro de las células U937:** Los resultados previos sugirieron la participación de una actividad de fosfatasa ácida en el proceso de sobrevivencia de *S. typhi* Ty2 dentro de células U937. Por lo tanto, según se esquematiza en la Figura 8, se midió la actividad de fosfatasa ácida en bacterias *S. typhi* Ty2 que permanecieron durante 20 h dentro de las células U937 (Ty2 interna). Esta actividad se comparó con la determinada para las bacterias *S. typhi* Ty2 que estuvieron durante 1 h por fuera de las células U937 (Ty2 externa). La medición de

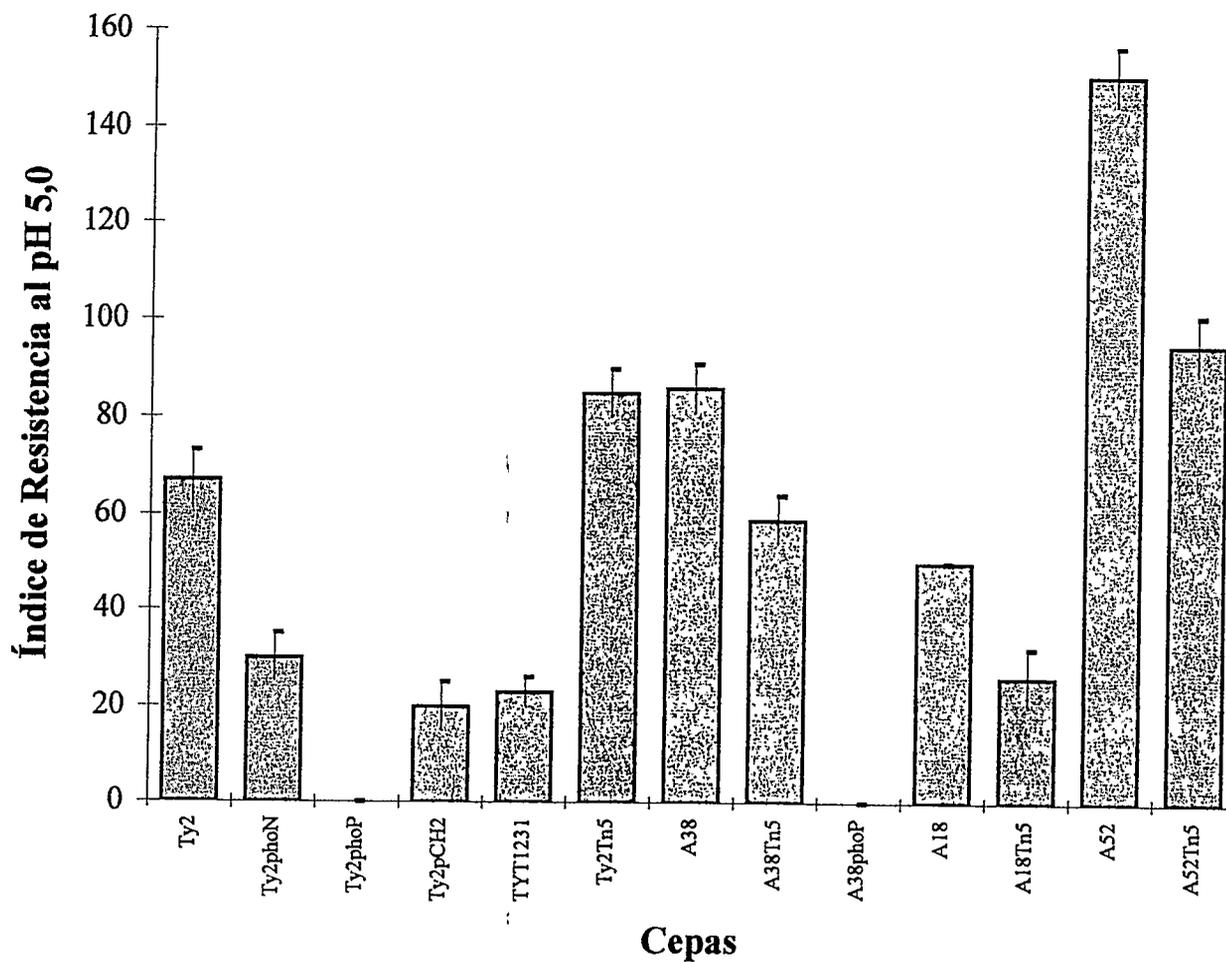


Figura 16: Índices de resistencia al pH 5 para cepas de *S. typhi* Ty2. Valores promedio  $\pm$  error estadístico de al menos tres determinaciones.

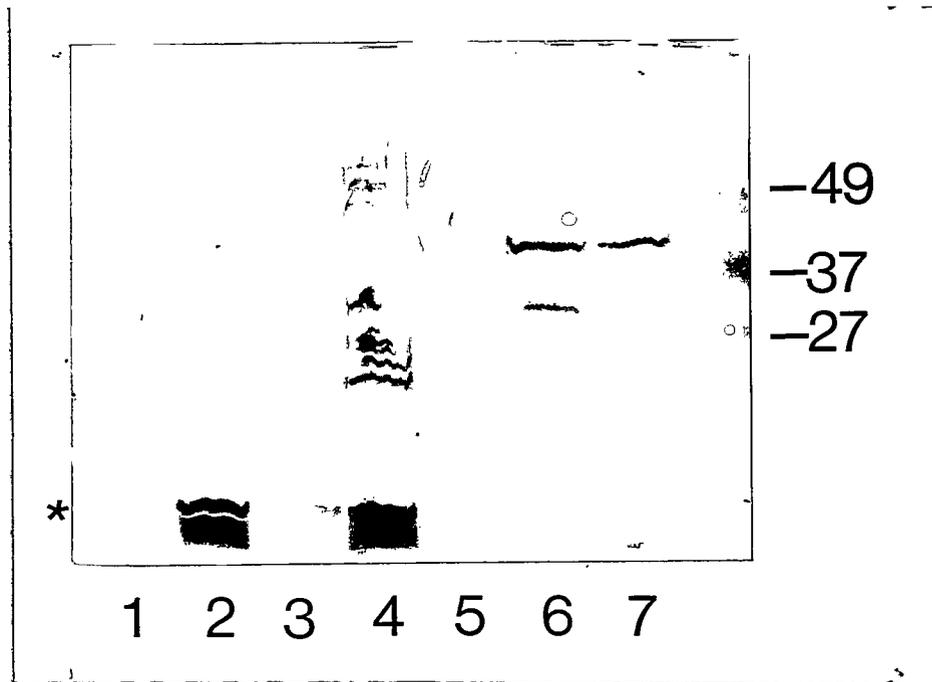
la actividad de fosfatasa se realizó a pH 5, puesto que éste es el pH que existe dentro de los fagosomas en los macrófagos y es el pH descrito para las determinaciones de actividad de fosfatasa ácida en *S. typhimurium*. Como se observa en la Tabla 5, a pH 5 la actividad de Ty2 interna es 48 veces mayor que la actividad de Ty2 externa (Tabla 5). Como control se utilizaron células infectadas con bacterias muertas por calor, y los valores obtenidos en la determinaciones de absorción fueron sustraídos a los valores generados por las células infectadas por bacterias vivas. Este resultado indica la participación de este tipo de actividad en la interacción bacteria-célula, pero no permite descartar la posibilidad de que parte de la actividad inducida sea de origen celular en respuesta a componentes de bacterias vivas.

**1.5. Detección de la fosfatasa bacteriana inducida dentro de las células U937:** Mediante inmunoelectroforésis utilizando anticuerpos anti fosfatasa alcalina, se revelaron bandas de proteínas que dan reacción cruzada con este antisuero en extractos de proteínas citoplasmáticas de células de *S. typhi* Ty2. Los extractos se prepararon utilizando bacterias que permanecieron en el interior de las células U937 durante 20 h (Figura 17, carriles 2, 3 y 4) y bacterias aisladas desde el extracelular coincubadas con las células U937 durante 1h (Figura 17, carriles 5, 6 y 7). Como se aprecia en la Figura 17, aparece un grupo de bandas reactivas en la zona de los 27 Kda en el extracto de *S. typhi* Ty2 que estuvo dentro de las células U937 por 20 h (Figura 17, carril 4). Estas bandas están ausentes en los extractos del mismo tipo preparados ya sea desde bacterias que permanecieron extracelulares durante 1 h (Figura 17, carriles 5, 6 y 7) como

**Tabla 5.** Actividad fosfatasa ácida en cepas *S. typhi* Ty2.

Cepas	Indice de Sobrevida	Actividad de Fosfatasa Acida	
		Unidades/bacterium	x 1,00E+07
Ty2	100	5,23 ± 0,6	
Ty2 $\phi$ hoN	74 ± 8 (n=3)	8,50 ± 0,5	
A18	439 ± 16 (n=3)	28,36 ± 0,4	
A18Tn5	177 ± 11 (n=3)	8,20 ± 0,4	
A38	676 ± 29 (n=6)	27,55 ± 0,5	
A38Tn5	134 ± 10 (n=5)	6,23 ± 0,2	
Ty2 ext		33,28 ± 6,6	
Ty2 int		1584,67 ± 45,66	

Valores promedio  $\pm$  error estadístico de al menos 3 determinaciones; n: indica el número de determinaciones realizadas.



**Figura 17:** Inmunoelctrotransferencia de extractos de bacterias coincubadas con células U937 y revelados con anticuerpo anti fosfatasa alcalina de *E. coli*. Carril 1: extracto de células U937 sin infectar; carriles 2, 3 y 4: extractos preparados con bacterias rescatadas desde el interior de las células U937 para las cepas *S. typhi* Ty2*phoN*, *S. typhi* Ty2 TYT1231 y *S. typhi* Ty2, respectivamente y carriles 5, 6 y 7: extractos de bacterias extracelulares coincubadas con las células U937 durante 1 h para las cepas *S. typhi* Ty2*phoN*, *S. typhi* Ty2 TYT1231 y *S. typhi* Ty2, respectivamente. \*: muestra la banda reactiva presente en el extracto de células U937 sin infectar y en las bacterias aisladas desde el espacio intracelular (carriles 1, 2, 3 y 4).

también, en el extracto preparado desde células U937 sin infectar (Figura 17, carril 1). En este último aparece una banda de una proteína pequeña (\*) que está presente también en los extractos de *S. typhi* Ty2*phoN* y TYT1231 rescatadas desde el intracelular de células U937 (Figura 17, carriles 1, 2, 3 y 4), la cual probablemente corresponde a una fosfatasa de origen eucariótico. Por otra parte, en los extractos preparados con las bacterias provenientes del interior de las células U937 *S. typhi* Ty2*phoN* y TYT1231 (Figura 17, carriles 2 y 3) no se detectó este grupo de bandas reactivas, probablemente debido a la baja sobrevivencia intracelular que tuvieron estas cepas en este ensayo, siendo imposible caracterizar las bandas de posibles fosfatasas que deberían estar ausentes en estas mutantes. De todas maneras este resultado negativo apoya la hipótesis de que estas bandas que aparecen inducidas en extractos de *S. typhi* Ty2 que estuvieron 20 h al interior de las células U937 (Figura 17, carril 4) son de origen bacteriano. Nuevamente, se demuestra que la participación de proteínas que dan reacción cruzada con anticuerpos anti-fosfatasa alcalina es importante en la interacción bacteria-célula.

## CAPITULO II:

### Mutantes de *S. typhi* Ty2 *phoP* y resistencia al pH 5.

#### 2.1. Obtención y caracterización de las mutantes *S. typhi* Ty2 *phoP* y A38 *phoP*:

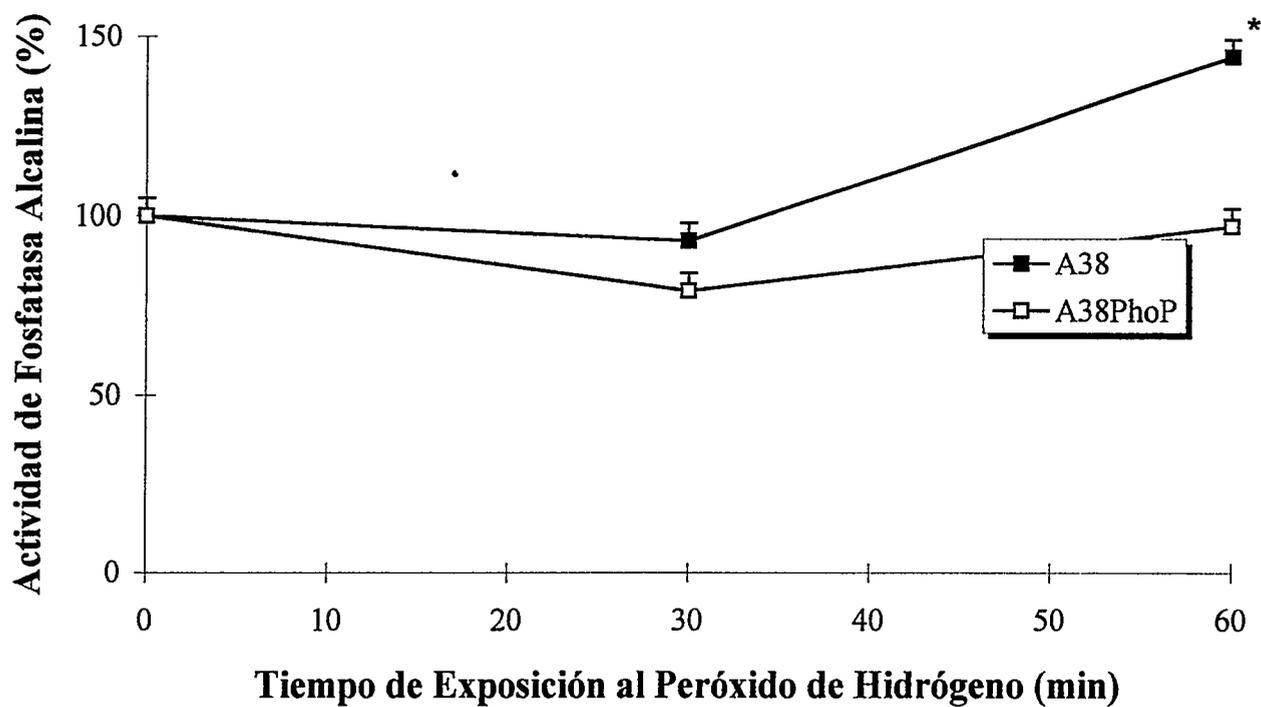
Debido al importante papel que cumple el regulador transcripcional PhoP en la interacción *S. typhimurium*-macrófago murino, en esta Tesis se obtuvo y caracterizó mutantes de *S. typhi phoP*. Estas mutantes fueron obtenidas mediante transducción y recombinación homóloga, vía el fago P22HT<sub>int</sub> desde las cepa de *S. typhimurium* MST223, la cual posee mutado el gen *phoP* por una inserción del mini transposón Tn10(dTet). Una vez obtenidas las transductantes resistentes a Tet, se les estudió fenotipos tales como: actividad de fosfatasa ácida, sensibilidad al pH ácido y sobrevida dentro de las células U937. Como se aprecia en la Figura 16, la cepa *S. typhi* Ty2 *phoP* es totalmente sensible al pH ácido, y disminuye la actividad de fosfatasa ácida y la capacidad de sobrevivir dentro de las células U937 (Figura 15A y 15B). Estos resultados sugieren que en *S. typhi* Ty2 el gen *phoP* regula otro gen de actividad de fosfatasa distinto de *phoN*, el cual sería importante para ambos procesos, tanto para la sobrevida intracelular como para la resistencia al pH 5. Para recuperar el fenotipo PhoP<sup>+</sup> de la mutante *S. typhi* Ty2 *phoP* por recombinación homóloga, la cepa *S. typhi* Ty2 *phoP* fue transducida con un lisado del fago P22HT<sub>int</sub> obtenido en la cepa *S. typhimurium* MST1 (cepa nativa) y se seleccionaron aquellas transductantes que perdieron la resistencia a Tet. En la revertante ha ocurrido el reemplazo del gen *phoP* mutado por el gen *phoP* de

*S. typhimurium* silvestre. Esta cepa resultante recuperó la actividad fosfatasa a pH 7 (actividad que está dada por PhoN) demostrando que el gen *phoP* de *S. typhimurium* es capaz de funcionar en *S. typhi* Ty2 al menos en la regulación de esta actividad.

## **2.2. Participación de *phoP* en la regulación por peróxido de la mutante *S. typhi* Ty2**

**Tn*phoA* A38:** La expresión del gen mutado en A38 se induce en presencia de estrés oxidativo (Tabla 2). Para estudiar la participación de *phoP* en esta regulación, se obtuvo mediante transducción y recombinación homóloga la cepa A38*phoP*. La cepa A38*phoP* resultó también totalmente sensible al pH 5 e incapaz de crecer en placas preparadas a pH 5 (Figura 16). La actividad fosfatasa alcalina en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue medida para ambas mutantes. Como se observa en la Figura 18, la actividad de fosfatasa alcalina en la cepa parental A38 aumenta después de 30 min de incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en cambio para la cepa A38*phoP* la actividad permanece sin cambio aparente durante este tiempo. Estos resultados sugieren que en *S. typhi* Ty2 existe al menos un gen cuya expresión frente a peróxido de hidrógeno es regulada a través del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.

**2.3. Resistencia de cepas de *S. typhi* Ty2 al pH ácido:** La resistencia al pH 5 fue evaluada en función de la fase de crecimiento de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (Figura 19). Tal como muestra la Figura 19 el índice de resistencia al pH ácido depende de la fase de crecimiento de la bacteria. Por esto, todos los ensayos de resistencia al pH 5 fueron realizados tomando alícuotas de los cultivos a densidad óptica de 0,2 a 600 nm.



**Figura 18:** Actividad de fosfatasa alcalina medida en presencia de peróxido de hidrógeno para las cepas A38 y derivada A38*phoP*. Las barras representan la desviación estadística y \* muestra que estos valores son significativamente distintos con un  $p < 0,05$  según el test de *t*'Student.

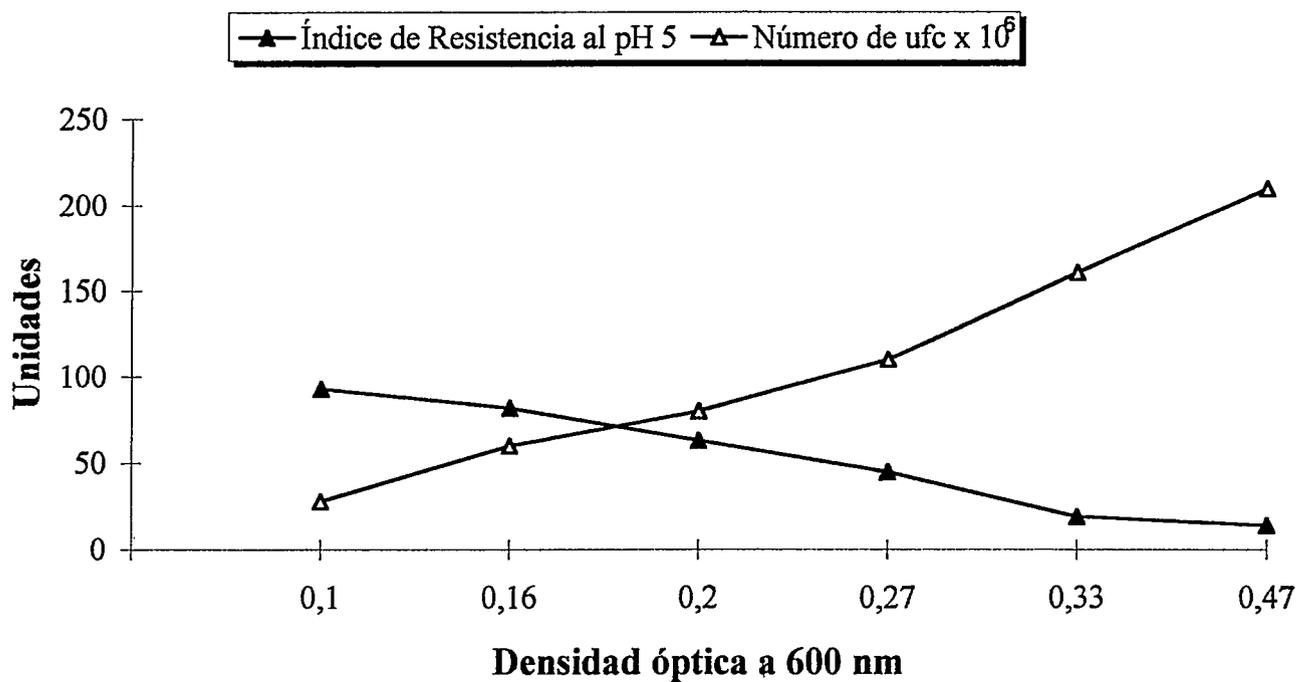


Figura 19: Índice de resistencia al pH 5 en función del crecimiento de la cepa de *S. typhi* Ty2.

Como se observa en la Figura 16, las mutantes que poseen el transposón *Tn<sub>phoA</sub>* resultaron más resistentes al pH ácido que las cepas isogénicas, derivadas *Tn5*, que perdieron la actividad de fosfatasa alcalina. Esta sensibilidad aumentada no fue producto de la presencia del transposón *Tn5*, puesto que una cepa de *S. typhi* Ty2 *Tn5* presentó un índice de resistencia al pH 5 muy similar a la cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Figura 16). Por otra parte, las cepas de *S. typhi* Ty2 mutantes en el gen *phoP* presentaron una sensibilidad total al pH ácido, siendo incapaces de crecer en esta condición (Figura 16) y la cepa TYT1231 carente de actividad de fosfatasa ácida también resultó bastante sensible al ácido con un índice de resistencia al pH 5 de sólo 23 unidades.

### CAPITULO III:

#### **Mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ: participación del LPS en la sobrevivencia bacteriana dentro de las células U937.**

**3.1. Obtención de mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ:** Las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ fueron obtenidas mediante transducción vía fago P22HT<sup>int</sup> desde la cepa de *S. typhimurium* MST1063. De esta manera el fago MudJ queda complementado *in cis* transitoriamente con las transposasas del fago ayudante Mud1, lo que permite la transposición de MudJ al cromosoma bacteriano. Se obtuvo un total de 9.000 mutantes *S. typhi* Ty2 resistentes a Kan. Estas mutantes fueron mezcladas y usadas para la infección y posterior selección desde el interior de las células U937.

**3.2. Selección de mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ desde el interior de las células U937:** La mezcla de mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ previamente descrita, fue utilizada para infectar la línea celular U937. Una vez eliminadas las bacterias extracelulares por la gentamicina y las bacterias en activa proliferación intra- y extracelulares por la acción de ampicilina, se aislaron las bacterias desde el espacio intracelular, las cuales permanecieron durante 20 h dentro de las células U937. Después de este tratamiento, un total de 160 mutantes fueron rescatadas, 67 (41%) resultaron auxótrofas para histidina, producto de la recombinación homóloga (debido a que en la cepa MST1063 MudJ se encuentra en el locus *his*), y 62 mutantes fueron X-Gal<sup>-</sup>, por lo cual fueron descartadas.

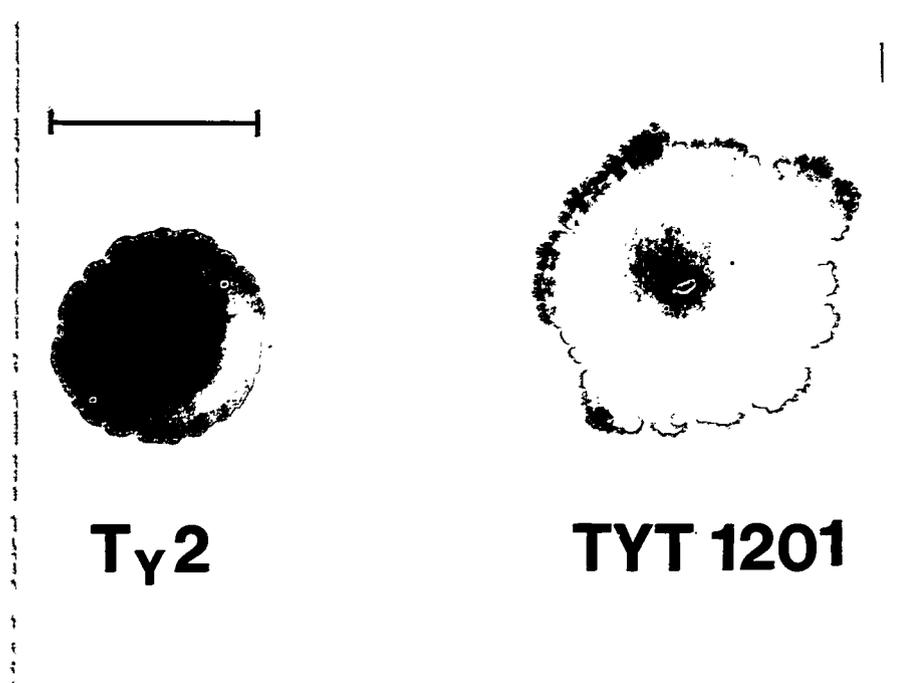
Finalmente, 31 mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ (XGal<sup>+</sup>) se caracterizaron en esta Tesis. Todas estas mutantes fueron sensibles al fago Ffm, indicando alteraciones en el antígeno O del LPS (Tabla 6) y protótrofas. Ninguna de las mutantes seleccionadas fue capaz de crecer en agar-Luria que contenía ampicilina (50 µg/ml) y tampoco presentaron alteraciones en el patrón de proteínas de membrana externa (datos no mostrados). Todas estas mutantes resultaron resistentes al fago Felix O indicando un *core* del LPS normal. En los experimentos controles, donde las células U937 fueron infectadas con la cepa silvestre de *S. typhi* Ty2, se recuperaron 21 ufc al tratar con ambos antibióticos (gentamicina y Amp). Todas estas cepas resultaron resistentes al fago Ffm; en cambio, fueron recuperadas 130.970 ufc cuando se realizó el tratamiento sólo con gentamicina, demostrando que Amp es efectivamente capaz de ingresar a las células U937 y actuar sobre células de *S. typhi* intracelulares en activa proliferación.

**3.3. Análisis de la regulación por estrés de las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ:** Se estudió la regulación de los genes mutagenizados frente a las tres condiciones de estrés empleadas en este estudio (Tabla 6). Un 52% (16 mutantes) respondieron frente a las condiciones de estrés empleadas; algunas de ellas, tales como: TYT1206, TYT1216, TYT1218, TYT1226 y TYT1230 presentaron regulación en las tres condiciones empleadas (Tabla 6). Ciertas mutantes; a saber: TYT1201, TYT1210, TYT1211, TYT1223 y TYT1230 presentaron una forma de colonia más difusa y de bordes rugosos en agar-Luria con respecto a la colonia de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (Figura 20).

Table 6. Características de *S. typhi* Ty2 y mutantes MudJ.

Cepas	Regulación por Estrés			Movilidad	Sedimenta en Medio Líquido
	Temp	H2O2	pH 5.0		
Ty2	-	-	-	+	No
TYT1200	↑	↑	NC	+	No
TYT1201	-	-	NC	-	Si
TYT1202	-	-	↑	-	Si
TYT1203	-	-	CP	-	Si
TYT1204	-	-	CP	+	Si
TYT1205	-	-	↑	+	No
TYT1206	↑	↑	↑	+	No
TYT1207	-	-	-	+	Si
TYT1208	-	-	-	+	No
TYT1209	-	-	-	+	No
TYT1210	-	↑	NC	+	Si
TYT1211	-	-	-	+	No
TYT1212	-	-	-	+	No
TYT1213	↑	-	-	+	Si
TYT1214	-	-	-	+	No
TYT1215	-	-	↑	+	No
TYT1216	↑	↑	↑	+	No
TYT1217	-	-	-	+	No
TYT1218	↑	↑	↑	+	No
TYT1219	-	-	↑	-	Si
TYT1220	-	-	-	+	No
TYT1221	-	-	↑	+	No
TYT1222	-	-	↑	+	No
TYT1223	-	↓	CP	+	Si
TYT1224	-	-	-	-	Si
TYT1225	-	-	-	+	Si
TYT1226	↓	↑	↑	-	Si
TYT1227	-	-	-	+	No
TYT1228	-	-	-	+	No
TYT1229	-	↑	-	-	Si
TYT1230	↑	↓	↑	+	No

En la regulación frente al estrés ↑: indica aumento de la coloración azul con respecto a la condición estandar de cultivo agar-Luria pH 7 a 37°C; ↓: disminución de la intensidad del azul, y -: no responde en la condición de estrés analizada. En movilidad +: móvil y -: inmóvil.



**Figura 20:** Colonias de *S. typhi* Ty2 y mutante TYT1201 creciendo en agar-Luria. La barra corresponde a 1 cm.

En placas de agar-Luria que contenían peróxido de hidrógeno y X-Gal se detectaron fusiones reguladas frente a la condición oxidativa. Siete mutantes resultaron inducidas y dos reprimidas cuando crecieron en presencia de  $H_2O_2$ . Las mutantes TYT1200, TYT1206, TYT1216, TYT1218 y TYT1226 las cuales son inducidas por  $H_2O_2$  también fueron reguladas por la temperatura entre 37°C-42°C (Tabla 6). Todas las mutantes inmóviles sedimentaron en medio de cultivo líquido caldo-Luria (Tabla 6). Sin embargo, hubo mutantes móviles que también sedimentaron en el caldo de cultivo indicando que ambos fenómenos no están directamente relacionados.

Once fusiones resultaron inducidas al crecer en placas agar-Luria a pH 5 y seis mostraron alteración en la capacidad de crecer o no crecieron en esta condición (Tabla 6). La falta de crecimiento en placas a pH 5 no necesariamente indica incapacidad de para enfrentar esta condición, ya que en este ensayo el inóculo de bacterias es aleatorio, en cambio, en la determinación cuantitativa de la resistencia al pH 5 el inóculo de bacterias es medido (ver a continuación).

**3.4. Resistencia al pH ácido de las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ:** Previamente se había establecido relación entre la resistencia al pH ácido y la capacidad de sobrevivir dentro de las células U937. Esta relación también fue detectada para las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ evaluadas TYT1200, TYTY1201, TYT1202 y TYT1203 (Figura 21). Por esto, se midió en todas las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ el índice de resistencia al pH 5. Como se aprecia en la Figura 21, la mayoría de las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ fueron altamente sensibles al pH ácido, especialmente sensibles resultaron las mutantes

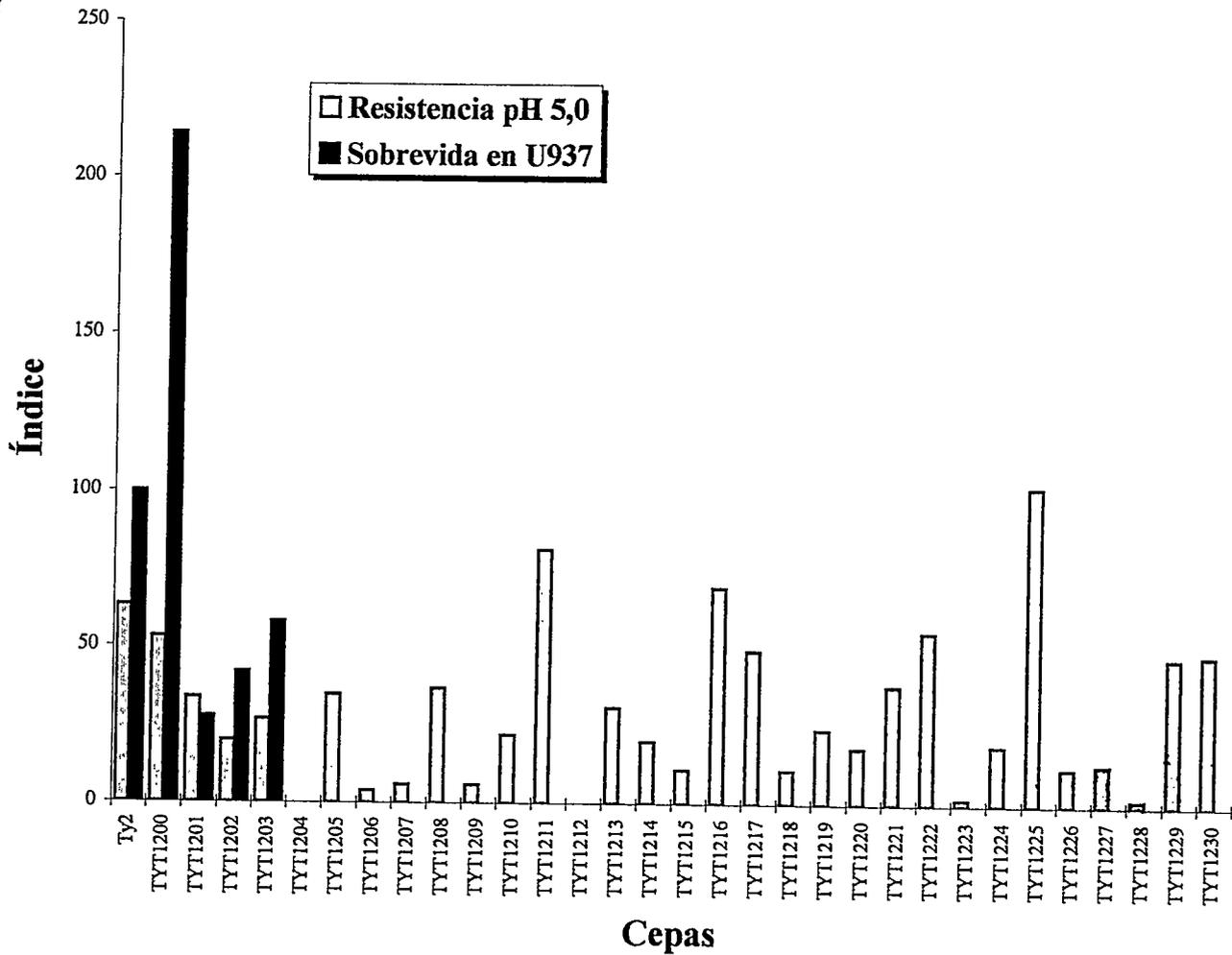


Figura 21: Índices de resistencia al pH 5 y de sobrevida dentro de las células U937 para mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ.

TYT1204, TYT1206, TYT1207, TYT1209, TYT1212, TYT1223 y TYT1228. Este resultado permite sugerir que probablemente la mayoría de las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ obtenidas en esta Tesis también sean incapaces de sobrevivir bien dentro de las células U937.

## DISCUSIÓN

En esta Tesis se construyeron y caracterizaron mutantes de *Salmonella typhi* Ty2 para estudiar el proceso de sobrevivencia dentro de los macrófagos humanos U937. La hipótesis plantea que en el proceso de resistencia de *S. typhi* al macrófago, los genes bacterianos regulados por condiciones de estrés, similares a las que podría encontrar al enfrentarse con el macrófago humano, juegan un papel importante. La estrategia experimental propone la mutagénesis por inserción de los transposones *TnphoA* y *MudJ*, de tal manera aumentar las posibilidades de detectar genes que participen en este proceso. Ambos transposones llevan genes indicadores de la expresión de los genes mutagenizados, permitiendo evaluar la expresión del gen afectado bajo distintas condiciones ambientales. En las mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* la primera selección fue de aquellas reguladas frente a las condiciones de estrés. Luego, a estas mutantes se les evaluó su capacidad de sobrevivir dentro de las células U937. Por otra parte, las mutantes *MudJ* fueron seleccionadas desde el interior de las células U937 y luego sometidas a los tres tipos de estrés. Utilizando estas dos estrategias experimentales distintas se amplían las posibilidades para encontrar los genes que codifican para proteínas con funciones importantes (factores de virulencia) en el fenómeno de resistencia al macrófago.

### Mutantes de *S. typhi* Ty2 Tn*phoA*

Uno de los principales objetivos de esta Tesis fue seleccionar mutantes en proteínas extracitoplasmáticas reguladas por estrés, ya que se esperaba que este tipo de proteínas cumplieran un papel importante en el fenómeno de resistencia al macrófago humano. Sin embargo, del total de 40 mutantes *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* reguladas por estrés, sólo 10 mutantes (25%) mostraron baja capacidad de sobrevivir dentro de las células U937, comparadas con la cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Tabla 3). En algunas de estas mutantes la proteína de fusión que se forma entre el gen mutagenizado y *phoA* podría tener una ubicación aberrante, interfiriendo con la fisiología normal de la bacteria; esto es especialmente probable en las mutantes 053, C79 y OA5, las cuales muestran también un pobre índice de entrada (Tabla 3). Se ha descrito una mutante de *S. typhimurium* que posee el Tn*phoA* insertado en las cercanías de la secuencia señal del gen *pagC* que codifica para una proteína que normalmente se destina a la membrana externa. La proteína de fusión que se produce se ubica aberrantemente en la membrana interna de la bacteria, donde causa fuertes trastornos pleiotrópicos (Miller y col., 1992). Otra posibilidad para explicar las fuertes alteraciones sufridas por las mutantes C79 y OA5 es que tuvieran alteraciones en el sistema de transporte de hierro mediado por la enteroquelina. Se ha demostrado que este

sistema en *S. typhi* participa en la virulencia sobre cultivos de células HeLa y en el modelo de infección de ratones con bacterias resuspendidas en mucina (Furman y col., 1994).

La condición de estrés donde se detectó un mayor número de mutantes que exhibían regulación fue en respuesta a la temperatura. En aquellas mutantes reprimidas por la temperatura (Tabla 2) podrían estar alterados los mecanismos de exportación de las proteínas en general. Por el contrario, la inducción de proteínas por la temperatura, podría formar parte de un mecanismo evolutivo de defensa, en donde participan las proteínas de estrés térmico. Las funciones de estas proteínas, en otros organismos, han sido caracterizadas como: chaperonas que preservan la estructura de otras proteínas esenciales para la viabilidad celular, proteasas que actúan sobre proteínas denaturadas y proteínas que forman estructuras de termo-protección o que participan en la exportación de proteínas extracitoplasmáticas (Ang y col., 1991 y Craig y col., 1993). En particular, se ha caracterizado la proteína PapD chaperona de *E. coli* que se localiza en el espacio periplásmico donde participa en el ensamblaje del pilus (Jacob-Dubuisson y col., 1993).

En este trabajo se obtuvieron mutantes, tales como A38, A82, C27 y 039, que responden frente a más de una condición de estrés (Tabla 2), indicando la posible participación de diferentes mecanismos regulatorios, segundos mensajeros comunes y/o *cross talk* entre los sistemas de transducción de señales bacterianas. En la respuesta defensiva contra el pH ácido en *S. typhimurium* se ha visto la coparticipación de proteínas de defensa contra el pH ácido y proteínas de estrés térmico (Foster y Bearson, 1994). También se ha detectado la participación de distintos *loci* regulatorios tales como: *fur*, *oxrG*,

*earAB*, *earC* y *ompR* (Foster, 1993 y Foster y col., 1994). Además, tanto frente al estrés térmico como frente al estrés oxidativo se ha detectado la producción de nucleótidos polifosforilados (denominados "alarmonas") que podrían actuar como segundos mensajeros (Christman y col., 1985 y VanBogelen y col., 1987). Un ejemplo de *cross talk* es la regulación que sufren las porinas OmpC y OmpF de *S. typhimurium* frente a diferentes condiciones ambientales, tales como variaciones en la temperatura y osmolaridad (Dorman, 1991); pH ácido (Foster y col., 1994) y presencia de agentes oxidantes (Demple, 1991).

Las mutantes A65 y A88 son interesantes ya que ambas tienen índices de entrada similares a la cepa nativa pero sus índices de sobrevivencia dentro de las células U937 se ven claramente afectados (Tabla 3). La mutante A65 es en un gen reprimido frente a la temperatura (Tabla 2). Este resultado sugiere que un gen reprimido, por una condición de estrés, podría participar en la virulencia de *S. typhi*. Para la virulencia de *S. typhimurium* es importante el papel de los genes *prg*, aquellos reprimidos por PhoP (Alpuche-Aranda y col., 1992; Behlau y Miller, 1993; Miller y col., 1990 y Belden y Miller, 1994). También, la mutante de *S. typhimurium phoP<sup>c</sup>* que expresa constitutivamente PhoP, es avirulenta. En esta mutante se ha propuesto que la baja expresión de los genes *prg* (que está totalmente ausente en *pho<sup>c</sup>*) sería necesaria para la virulencia de *S. typhimurium* en el ratón (Miller y Mekalanos, 1990).

Por otra parte, alguna de las seis mutantes *S. typhi* Ty2 Tn*phoA* inducidas frente al peróxido de hidrógeno podría tener insertado el transposón en un gen que codifique para

una catalasa de tipo II, ya que estas enzimas se ubican en espacio periplásmico de la bacteria (es decir, proteínas extracitoplasmáticas que son los probables blancos de la mutagénesis con *TnphoA*); son enzimas requeridas para la inactivación del peróxido de hidrógeno y se inducen en respuesta al estrés oxidativo. Se ha descrito en *S. typhimurium* la inducción de una catalasa de tipo II (catalasa/peroxidasa) en respuesta al peróxido de hidrógeno. Esta proteína es un buen antígeno para la inducción de inmunidad celular, y protege a los ratones contra la infección por *S. typhimurium* patógena (Kagaya y col., 1992). Llama la atención el hallazgo en este estudio de que la inducción de los mismos niveles de protección, no se pudo conseguir inmunizando ratones con la catalasa de tipo I, cuya expresión es constitutiva en *S. typhimurium* (Kagaya y col., 1992).

Del total de las mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* estudiadas, un 50% (20 mutantes) mostró una mejor capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos U937 que la cepa nativa y la mayoría resultó semi-sensible al fago Ffm. Debido a que se están pesquisando mutantes en proteínas extracitoplasmáticas, es frecuente encontrar alteraciones en el antígeno O del LPS. En base a los antecedentes disponibles para otras bacterias patógenas facultativas intracelulares, que poseen fosfatasas ácidas como factores de virulencia (Dowling y col., 1992 y Bliska y col., 1992) se postuló la actividad de fosfatasa alcalina otorgada por el transposón *TnphoA* como la causante del efecto protector observado. Para demostrarlo se construyeron derivadas de las mutantes *TnphoA* con el transposón Tn5 que específicamente perdieran la actividad fosfatasa. Las derivadas Tn5 obtenidas disminuyeron la actividad de fosfatasa alcalina (Tabla 4), presentaron índices de sobrevivencia cercanos a los

de cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Figura 15B) y también disminuyeron sus índices de resistencia al pH 5 (Figura 16), con respecto a la mutante *TnphoA* parental. Estos resultados sugieren que la actividad de fosfatasa dada por el gen *phoA* de *E. coli*, le otorga a *S. typhi* una mejor capacidad para resistir al pH ácido y para sobrevivir dentro de los macrófagos U937. Previamente se han obtenido mutantes por inserción del transposón *TnphoA* en *S. typhimurium* y en *S. abortusovis* y se ha caracterizado su virulencia *in vitro* e *in vivo*. En estos trabajos no ha sido detectado un efecto como el observado en esta Tesis (Johnson y col., 1991; Belden y Miller, 1994 y Rubino y col., 1993).

El gen *phoA* y el operón de la lactosa no existen en el genoma de *Salmonella*. Se ubican en uno de los *loops* que se forman al hibridizar el DNA cromosomal de *E. coli* con DNA cromosomal de *S. typhimurium* (Groisman y col., 1992b). Por otra parte, en *E. coli* no existe el gen *phoN*. Sin embargo, se detecta actividad de fosfatasa ácida inespecífica producto de la acción de PhoA (Kasahara y col., 1991). En algunas de las mutantes de *S. typhi* Ty2 *TnphoA* obtenidas en esta Tesis se detectó actividad de fosfatasa, medida a pH ácido, mayor que la determinada en la cepa nativa *S. typhi* Ty2 (Tabla 5). Este resultado indica que el gen *phoA* foráneo para *S. typhi*, en estas mutantes da cuenta de una mayor actividad fosfatasa ácida inespecífica. Los resultados permiten sugerir la participación de una fosfatasa bacteriana funcional a pH ácido en el fenómeno de sobrevivencia intracelular en macrófagos U937. En *S. typhimurium* PhoN es una fosfatasa ácida inespecífica regulada por PhoP y no es un factor de virulencia (Galán y Curtiss, 1989 y Miller y col., 1989). Nuestros resultados indican que en *S. typhi* PhoN tampoco cumpliría un papel importante al

menos en los procesos de resistencia al pH ácido y de sobrevivencia dentro de las células U937 (Figura 15A y Figura 15B). Además de PhoN, en *S. typhimurium*, se han detectado otras tres actividades de fosfatasa ácida, una de las cuales corresponde a una fosfatasa ácida inespecífica de tipo II, también regulada por PhoP cuyo papel en la virulencia de *S. typhimurium* aún es desconocido (Galán y Curtiss, 1989).

Para intentar caracterizar mejor la participación de la actividad fosfatasa dada por el gen *phoA*, se transformó la cepa nativa con el plasmidio multicopia pCH2 (derivado de pBR322). Esta cepa transformada disminuyó su capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos U937. Más aún la presencia del plasmidio afectó también la capacidad de resistir al pH ácido (Figura 15A, Figura 15B y Figura 16). La presencia de un plasmidio con un alto número de copias (30-50) puede ocupar gran parte de la maquinaria bacteriana, impidiendo la síntesis de los elementos requeridos para sobrevivir dentro de los macrófagos. La cepa de *S. typhi* Ty2pCH2 expresa abundantemente la proteína plasmidial PhoA en el espacio periplásmico, como lo demuestra la Figura 14, quizás saturando el sistema de exportación bacteriano.

En la cepa nativa de *S. typhi* Ty2 usada en este estudio fue posible detectar la inducción de una actividad de fosfatasa medida a pH ácido, en bacterias que estuvieron 20 h en el interior de las células eucarióticas (Tabla 5). También, se intentó detectar la inducción de esta actividad frente a diversas condiciones de estrés *in vitro*, creciendo la bacteria en presencia de peróxido de hidrógeno, en pH 5, en medio mínimo y en fase estacionaria de crecimiento (datos no mostrados). En ninguna de estas condiciones se pudo detectar

inducción de actividad de fosfatasa. Aparentemente es difícil reproducir *in vitro* el complejo ambiente intracelular de los macrófagos. En *S. typhimurium* se han estudiado los cambios en los patrones de proteínas, mediante electroforesis en dos dimensiones, y se ha demostrado que ciertas condiciones *in vitro* de estrés no inducen las mismas proteínas que se expresan cuando la bacteria ha estado dentro de macrófagos en cultivo (Abshire y Neidhart, 1993).

Mediante inmunoelectrotransferencia y utilizando anticuerpos contra fosfatasa alcalina se detectaron proteínas de aproximadamente 27 Kda, en extractos de *S. typhi* Ty2 que estuvieron dentro de las células U937 durante 20 h. Las fosfatasas ácidas inespecíficas en *S. typhimurium* son: PhoN o fosfatasa ácida inespecífica de tipo I, de aproximadamente 26 K, regulada por PhoP (Kier y col., 1979 y Kasahara y col., 1991) y fosfatasa ácida inespecífica de tipo II, tetrámero constituido por subunidades de 24 K (Uerkvitz, 1988), también regulada por PhoP (Galán y Curtiss, 1989). Además se han detectado actividades de fosfatasas ácidas sobre fosfohexosas y sobre 2'-3'-nucleótidos fosfodiésteres (Kier y col., 1977). Por otra parte, la mutante deficiente en actividad de fosfatasa ácida TYT1231 obtenida en este estudio en la cepa *S. typhi* Ty2 *phoN* mostró un bajo índice de sobrevivencia siendo su índice de entrada del mismo nivel que el de la cepa silvestre *S. typhi* Ty2. La mutante además resultó sensible al pH 5 y la expresión del gen afectado es inducida a pH 5. Estos resultados apoyan la hipótesis previamente planteada de que una actividad de fosfatasa ácida de *S. typhi* Ty2 participa en la sobrevivencia dentro de las células U937.

Se han acumulado evidencias indicando que uno de los mecanismos más importantes por los cuales los patógenos procariontes interfieren en los procesos de las células eucarióntes es a través de la defosforilación de residuos tirosina (Bliska y col., 1993; Bliska y Falkow, 1993; Bliska y col., 1992 y Clemens y col., 1991). En *Yersinia* spp. parásito intracelular del macrófago, la proteína YopH es un factor de virulencia con actividad de tirosina fosfatasa ácida (Bliska y col., 1992; Straley y col., 1993 y Bliska y Falkow, 1993). YopH es secretada directamente al interior del macrófago, a través de un poro que se forma entre ambas membranas, la eucariótica y la procariótica, y una vez dentro defosforila proteínas del macrófago inhibiendo el proceso de fagocitosis (Bliska y col., 1992). Todas las detecciones de actividad de fosfatasa en esta Tesis se realizaron midiendo la hidrólisis del sustrato p-nitro-fenilfosfato, cuya estructura es similar a la de un residuo de tirosina fosforilado (Keyse y Emslie, 1992) indicando que la(s) enzima(s) estudiada(s) podría(n) actuar sobre este tipo de sustratos que son más abundantes en células eucarióticas. En otra bacteria Gram negativa parásito intracelular facultativo *Legionella micdadei*, una fosfatasa ácida secretada también ha sido caracterizada como factor de virulencia (Dowling y col., 1992). Esta enzima bloquea la activación de los neutrófilos hidrolizando segundos mensajeros, tales como: fosfatidil inositol 4,5-difosfato e inositol trisfosfato (Saha y col., 1988).

La actividad fosfatasa ácida de *S. typhi* inducida dentro de las células U937, podría interferir con los procesos de activación del macrófago especialmente si se tratara de una enzima bacteriana secretada. En esta Tesis no se pudo detectar, en sobrenadantes de cultivo

de *S. typhi* crecida en distintas condiciones, actividad de fosfatasa (datos no mostrados). En etapas tempranas de la infección de macrófagos peritoneales murinos por *S. typhimurium* ocurre la fosforilación de proteínas celulares (Saito y col., 1994). Quizás infecciones con *S. typhi* también producen una respuesta similar en los macrófagos que podría ser modificada por la actividad de fosfatasa bacteriana inducida intracelularmente. Tal vez, una enzima con actividad de fosfatasa en *S. typhi* podría actuar sobre proteínas propias que formen parte de algún sistema de dos componentes y de esta manera participar en la regulación de la expresión génica bacteriana en respuesta a estímulos estresantes. También en fibroblastos humanos expuestos a estrés oxidativo o estrés térmico se induce la expresión de una tirosina fosfatasa ácida, ésta probablemente participa en los procesos regulatorios de defensa de la célula eucariótica (Keyse y Emslie, 1992). Basándose en que el efecto protector de la actividad de fosfatasa también se observó *in vitro* en placas de agar-Luria a pH 5, otra alternativa podría ser que esta actividad permitiera la generación de compuestos tamponantes del entorno bacteriano. La hidrólisis de polifosfatos en el hongo *Dunaliella salina* ocurre en estrés alcalino y ha sido propuesta como mecanismo tamponante contra el pH alcalino (Pick y col., 1990).

En *Klebsiella aerogenes* se ha detectado una actividad de fosfatasa ácida inespecífica que es sintetizada en cultivo continuo e inducida en hambruna de carbohidratos. Para esta enzima se ha propuesto una función en el transporte de azúcares fosforilados, los cuales deben ser desfosforilados para atravesar la membrana citoplasmática (Bolton y Dean, 1972). Tal vez, dentro de las células U937 existe limitación de algún nutriente capaz de inducir la

actividad fosfatasa observada. Esta fosfatasa le daría a la bacteria ventajas para sobrevivir en condiciones adversas ya que podría producir substratos tales como carbohidratos (fuentes de carbono) o fosfatos (importante en condiciones de hambruna de fósforo); en todo caso esto no explicaría el efecto protector de la fosfatasa cuando las bacterias crecen en placas agar-Luria a pH 5 (considerado un medio rico en nutrientes).

### **Mutantes de *S. typhi* Ty2*phoP***

En *S. typhimurium* se ha demostrado ampliamente que los genes de virulencia sufren regulación frente a diversas condiciones de estrés, tales como: pH ácido, agentes oxidantes, temperatura, hambruna de nutrientes y presencia de defensinas (Alpuche-Aranda y col., 1992; Behlau y Miller, 1993; Engraber y Loos 1992; Christman y col., 1985; Fierer y col., 1993; Francis y Gallagher, 1993; Johnson y col., 1991 y Valone y col., 1993; revisión en Mekalanos, 1992). En la regulación de la respuesta en contra del pH ácido y de las defensinas participa el sistema PhoP/PhoQ (Behlau y Miller, 1993 y Miller y col., 1989), el cual no había sido previamente estudiado en *S. typhi*. En esta Tesis se obtuvo mediante recombinación homóloga mutantes *S. typhi* Ty2 *phoP*. Estas mutantes disminuyeron la actividad fosfatasa ácida (Figura 15A) y la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos U937 (Figura 15B) además resultaron notablemente sensibles al pH 5 (Figura 16). Todos estos fenotipos concuerdan con los descritos previamente para la mutante *S. typhimurium*

*phoP* (Galán y Curtiss, 1989). El fenotipo XP<sup>-</sup> de la mutante *S. typhi* Ty2 *phoP* fue revertido al transducir con un fago obtenido en la cepa *S. typhimurium* MS1 (LT2 o cepa silvestre de *S. typhimurium*). Este resultado demuestra que el gen PhoP proveniente de *S. typhimurium* puede ser funcional en *S. typhi*, al menos en la regulación de la actividad de fosfatasa ácida.

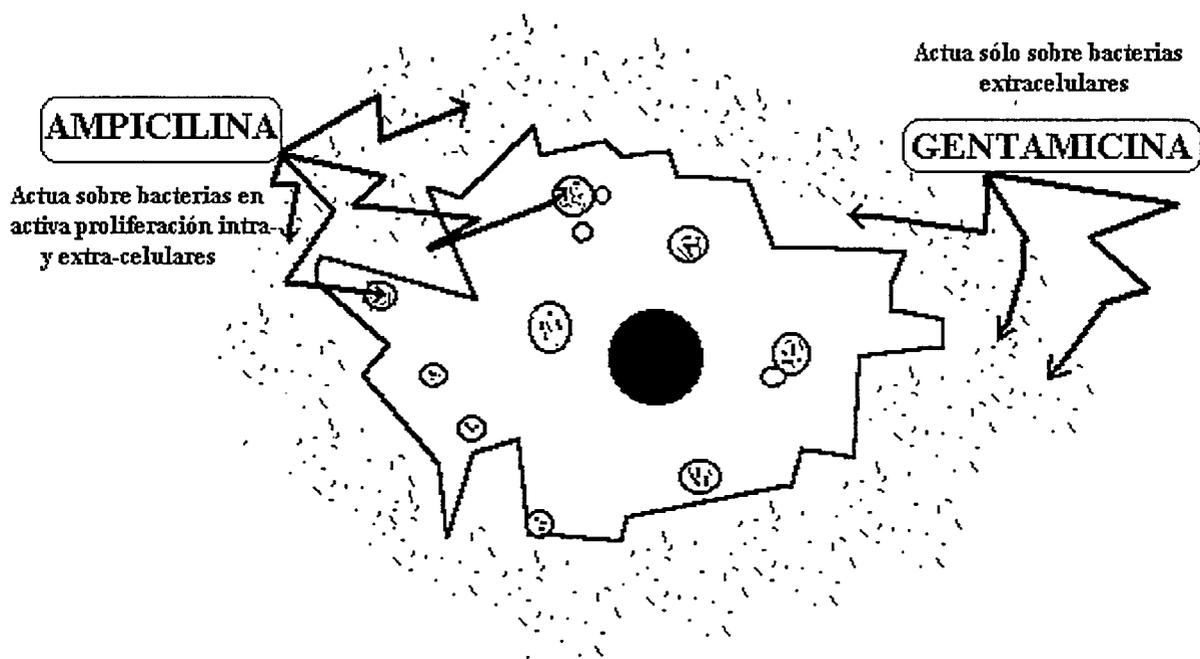
Para estudiar la participación de PhoP en la regulación de la mutante A38 frente al peróxido de hidrógeno, por transducción y recombinación homóloga se obtuvo la cepa A38*phoP*. Esta mutante fue incapaz de responder a la presencia del peróxido de hidrógeno después de una incubación de 60 min (Figura 18). Estos resultados demuestran que PhoP en *S. typhi* Ty2 regula la respuesta de al menos un gen frente al peróxido de hidrógeno. Esta función de PhoP no había sido descrita previamente para otras especies de *Salmonella* estudiadas.

### **Mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ**

Las mutantes MudJ fueron seleccionadas a través de un método de selección positiva. Mediante este método se pudo aislar aquellas mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ que específicamente resistieron la acción de Amp desde dentro de las células U937. Este tipo de selección es necesaria cuando se requiere analizar individualmente un número alto de mutantes (este trabajo requería el análisis de al menos 9.000 mutantes). De esta manera, se rescatan directamente las mutantes que interesan y en este caso fueron sólo 31 mutantes. El

método de selección está basado en el uso de los antibióticos gentamicina y Amp, el primero actúa sobre las bacterias extracelulares (Lissner y col., 1983 y Vladoianu y col., 1990) y el segundo actúa sobre bacterias que se dividen activamente tanto intra como extracelularmente (Figura 22). Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos pueden acceder a través de las membranas plasmáticas de células eucarióticas (Camilli y col., 1989 y Lowrie y col., 1979) y actuar en contra de *S. typhi* en particular (Chang y col., 1990). En el experimento control realizado en esta Tesis, infectando las células U937 con *S. typhi* Ty2 en ausencia de Amp, se rescataron 130.970 ufc, en cambio, en presencia de ambos antibióticos sólo 21 ufc fueron recuperadas, demostrando así que Amp efectivamente es capaz de ingresar a la célula U937 y actuar sobre *S. typhi* Ty2 intracelular.

Todas las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ seleccionadas poseen alteraciones del antígeno O del LPS ya que son sensibles al fago Ffm (Wilkinson y col., 1972). El antígeno O en *S. typhimurium* tendría una importante función protectora en contra de las defensinas o péptidos catiónicos (Stinavage y col., 1989 y Rana y col., 1991). Tal vez, estas mutantes al tener alterado el antígeno O sean más sensibles a estos factores antibacterianos del macrófago, por lo tanto, incapaces de multiplicarse dentro de las células e insensibles a la ampicilina. La mayoría de las mutantes MudJ seleccionadas en este estudio son altamente sensibles al pH 5 (Figura 20) otro de los mecanismos antibacterianos dentro de los macrófagos. Previamente, analizando individualmente la sensibilidad a las defensinas de 20.000 mutantes MudJ de *S. typhimurium*, se detectaron 18 mutantes hipersensibles, 11 de las cuales perdían la patogenicidad en ratones. Entre ellas se caracterizaron una mutante en



**Figura 22:** Esquema representativo de la acción de los antibióticos gentamicina y ampicilina sobre bacterias intra y extracelulares en macrófagos.

el gen *phoP* y otra mutante rugosa (Groisman y col., 1992a). Las mutantes TYT1204 y TYT1212 son absolutamente sensibles al pH ácido (Figura 21) y podrían tener localizada la mutación en el gen *phoP*, aunque la mutante en *phoP* obtenida por recombinación homóloga desde *S. typhimurium* en esta Tesis es una mutante lisa resistente al fago Ffm.

La importancia del antígeno O del LPS para la virulencia de *S. typhimurium* en ratones ha sido ampliamente demostrada (Valtonen, 1970; Collins y col., 1991; Mäkelä y col., 1973; Stinavage y col., 1989 y Rana y col., 1991). Existen mutantes de *S. typhimurium* que pierden parcialmente el antígeno O del LPS. Estas mutaciones se ubican en los genes *pmi* (que codifica para la enzima 6-fosfomanosa isomerasa) o *rfc* (mutantes en las que a cada unidad de *core* se le asocia a lo más una unidad de antígeno O). Estas mutantes fueron atenuadas en la virulencia para el ratón; sin embargo, no perdieron la capacidad de persistir en los macrófagos de las placas de Peyer, del bazo y de los tejidos más profundos; además resultaron efectivas como vacunas orales vivas en el modelo murino (Collins y col., 1991). alguna de las mutantes *S. typhi* seleccionadas en esta Tesis podrían tener una mutación de este tipo, permitiendo la persistencia de la mutante dentro de macrófagos U937 aún después de la acción de Amp.

La integridad del LPS de *S. typhi* es esencial para la invasión de células epiteliales HeLa (Mroczenski-Wildey y col., 1989) y para la entrada a macrófagos U937 (Contreras y col., 1995). La alteración del antígeno O en las mutantes MudJ obtenidas en esta Tesis aparentemente no impide la entrada a las células U937, de otro modo hubiese sido difícil su selección desde el ambiente intracelular de las células en cultivo.

En esta Tesis se obtuvo un alto número de mutantes *S. typhi* MudJ que sedimentaban en los cultivos líquidos. Este fenotipo ha sido asociado con un aumento de la hidrofobicidad superficial de las bacterias, lo que ocurre cuando se disminuye la cantidad de antígeno O dejando más expuesta porciones menos polares del LPS, tales como el lípido A. *Pseudomonas syringae* a bajas temperaturas modifica la hidrofobicidad superficial fosforilando el LPS (Ray y col., 1994). Cómo un aumento de la hidrofobicidad podría impedir que la bacteria se duplicara y evadiera la acción de la ampicilina es difícil de explicar. Quizás esta modificación le permite alcanzar compartimentos intracelulares impermeables a Amp. Ninguna de estas mutantes creció en placas de agar-Luria conteniendo Amp (50 µg/ml), por lo tanto es poco probable que modificaran su permeabilidad al antibiótico, debido a alguna mutación espontánea adquirida durante el proceso de selección.

Todas las mutantes de *S. typhi* Ty2 MudJ seleccionadas, tienen alterado el antígeno O del LPS. Para explicar esto, existen al menos tres posibilidades: 1) la inserción del transposón MudJ produce en *S. typhi* Ty2 esta alteración, 2) la inserción del transposón ocurrió en genes no relacionados con la síntesis del antígeno O, pero se seleccionaron positivamente mutaciones espontáneas del LPS y 3) la inserción del transposón ha ocurrido en genes relacionados directa o indirectamente con la síntesis del antígeno O del LPS. La primera explicación no es muy probable ya que previamente en nuestro laboratorio se ha analizado un panel de 12.000 mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ y han aparecido con alta frecuencia mutantes resistentes al fago Ffm (Tesis Doctor en Bioquímica, Inés Contreras).

La segunda explicación se descarta debido al resultado obtenido con el experimento control de infección de las células U937 con la cepa nativa *S. typhi* Ty2, desde donde se recuperaron 21 ufc todas resistentes al fago Ffm.

La tercera explicación es la más favorecida aunque es poco probable debido a la diversidad de fenotipos obtenidos (regulación frente a las condiciones de estrés, ver Tabla 6). Sin embargo, existe en distintas bacterias regulación del LPS en respuesta a diversos estímulos ambientales. Así, *Pasteurella haemolytica* modifica los componentes de bajo peso molecular del LPS en función de la disponibilidad de oxígeno (Davies y col., 1992), *Yersinia enterocolitica* modifica también la estructura del LPS en respuesta a la temperatura. Al subir la temperatura desde 30°C a 37°C ocurre una transición en la cepa Ye3827 la cual se transforma de lisa en semi-rugosa (Kawaoka y col., 1983), posteriormente se ha establecido que a 37°C se inhibe la transcripción de la región *rfb* (Al-Hendy y col., 1991). En *E. coli* se ha detectado variaciones en el contenido de manosa del antígeno O del LPS en respuesta a alteraciones en las condiciones de crecimiento (Taylor y col., 1981) y la reducción en la expresión del gen *rfaJ* a 42°C (Pradel y Schnaitman, 1991). Más aún la síntesis y ensamblaje del LPS involucra un gran número de genes y es un proceso de alta complejidad (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

No se detectaron alteraciones en el patrón de proteínas de la membrana externa en las mutantes MudJ obtenidas en esta Tesis, sin embargo, alguna de las numerosas proteínas del espacio periplásmico o de la membrana citoplasmática bacteriana podrían ser el blanco de

la mutación por MudJ, conllevando la alteración del antígeno O que se observa en todas las mutantes obtenidas.

Las mutantes TYT1200, TYT1201 y TYT1211 mostraron una capacidad similar o superior para resistir al pH 5 que la cepa parental. Quizás, esta capacidad para resistir al pH ácido dentro de las células U937, determina que superen el proceso de selección positiva o que alcancen algún compartimento intracelular especial impermeable a la acción de Amp. Este tipo de mutantes es interesante, podrían tener una virulencia aumentada. La mayoría de los estudios realizados para la caracterización de los factores de virulencia bacterianos, han buscado la pérdida de alguna función importante en las mutantes, lo que ocurre frecuentemente cuando la mutación ha sido pleiotrópica o en genes denominados *house keeping* (aquellos esenciales para el metabolismo bacteriano). En cambio, una mutación que aumenta cierta capacidad de la bacteria, probablemente, está eliminando algún elemento que interfiere *per se* (por ejemplo, algún gen que debe ser reprimido) o está afectando a algún gen regulador, permitiendo la expresión constitutiva del factor requerido para el proceso analizado. Así por ejemplo, el locus *mviA* de la cepa *S. typhimurium* WB600 ha sido caracterizado como un gen de avirulencia, este locus debe estar mutado para que la bacteria sea virulenta en ratones Ity<sup>s</sup> (Benjamin y col., 1991).

El método de selección positiva en presencia de Amp ha permitido previamente la caracterización de un factor de virulencia de *Listeria monocytogenes*: la Listeriolisina, cuya expresión es inducida frente a la temperatura y al estrés oxidativo (Camilli y col., 1989; Sokolovic y Goebel, 1989 y Sokolovic y col., 1990). En esta Tesis 16 de las 31 mutantes

MudJ seleccionadas (52%) responde a alguna de las tres condiciones de estrés utilizadas. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada: los genes regulados por estrés en *S. typhi* cumplen un papel importante en el fenómeno de sobrevivencia dentro de los macrófagos U937. Otro supuesto de la hipótesis es que los elementos que participan en la sobrevivencia intracelular de *S. typhi* son elementos de la superficie bacteriana. Cuando se infectan ratones con *S. typhi* resuspendida en mucina se logra que la bacteria sobreviva dentro de los macrófagos peritoneales murinos; por el contrario, infectando en ausencia de mucina, las bacterias son totalmente eliminadas por el sistema fagocítico murino (Sein y col., 1993). La mucina tiene un efecto protector de la superficie de la bacteria, confirmando la hipótesis de que la superficie es importante en el proceso de sobrevivencia intracelular aún en macrófagos de otra especie no susceptible a esta bacteria.

También, en esta Tesis se ha encontrado una clara relación entre la resistencia *in vitro* al pH 5 y la capacidad de *S. typhi* Ty2 de sobrevivir dentro de las células U937. Estos resultados sugieren que un mecanismo importante por el cual la bacteria sobrevive intracelularmente es respondiendo y regulando su expresión génica frente al pH ácido, de tal manera, que sobrelleva ésta y las otras condiciones de estrés producidas por los macrófagos.

## CONCLUSIONES

- La expresión de genes afectada por la temperatura en *S. typhi* Ty2 es importante para enfrentar la condición de pH 5.
- *S. typhi* Ty2 posee actividades fosfatasa distintas de PhoN que funcionan a pH ácido y que interfieren con el análisis de la regulación frente al pH 5.
- La actividad de fosfatasa alcalina expresada por el transposón *TnphoA* mejora la capacidad de sobrevivir dentro de las células U937 de *S. typhi* Ty2.
- La pérdida de la actividad de fosfatasa alcalina en las mutantes *S. typhi* Ty2 *TnphoA* A38, A18 y A52 ocasiona la disminución en la capacidad de sobrevivir dentro de las células U937 y la disminución en la resistencia al pH 5.
- En la interacción *S. typhi* Ty2 macrófago U937 participan proteínas que dan reacción cruzada con anticuerpos anti fosfatasa alcalina de *E. coli* y se detecta la inducción de una actividad de fosfatasa funcional a pH 5.
- La actividad de fosfatasa ácida de *S. typhi* Ty2 es importante para los fenómenos de sobrevivencia dentro de las células U937 y resistencia al pH 5, como lo demuestra los resultados obtenidos con la mutante TYT1231 obtenida en esta Tesis.

- La expresión del gen mutado en la cepa *S. typhi* Ty2 TYT1231 es inducida a pH 5. Confirmando que el estrés es una señal importante para la expresión de proteínas que participan en la sobrevivencia de *S. typhi* Ty2 dentro de macrófagos U937.
- El regulador transcripcional PhoP de *S. typhimurium* es homólogo al de *S. typhi* y en *S. typhi* Ty2 funciona en la regulación de la actividad de fosfatasa a pH 7.
- El regulador transcripcional PhoP en *S. typhi* Ty2 participa en la inducción de la expresión de un gen inducido frente al estrés oxidativo del peróxido de hidrógeno y también es importante para la resistencia al pH 5 y para la sobrevivencia dentro de las células U937.
- La resistencia al pH 5 por parte de *S. typhi* Ty2 es un fenómeno que depende de la fase de crecimiento de la bacteria y puede ser uno de los factores detectados importantes para evitar la acción lítica del macrófago.
- El antígeno O del LPS es importante para el fenómeno de sobrevivencia dentro de las células U937 como lo demuestra la selección de mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ desde el interior de las células U937 en presencia de ampicilina, donde todas las mutantes seleccionadas resultaron semisensibles al fago Ffm.
- El 60% de las mutantes *S. typhi* Ty2 MudJ tienen reducida la capacidad de resistir al pH 5, y la transcripción del gen mutagenizado en el 50% de éstas exhibió regulación frente a las condiciones de estrés empleadas en este estudio.

## BIBLIOGRAFIA

**Abshire, K. Z. y Neidhardt, F. C.** (1993) Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J. Bacteriol.* **175**:3734-3743.

**Al-Hendy, A., Toivanen, P. y Skurnik, M.** (1991) The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not *rfa* region. *Microbial. Pathogenesis* **10**:81-86.

**Alpuche Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W. P. y Miller, S. I** (1992) *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10079-10083.

**Ang, D., Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M. y Georgopoulos, C.** (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 24233-24236.

**Armstrong, J. y D'Arcy Hart, P.** (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* **134**:713-730.

- Bäumler, A. J., Kusters, J. G., Stojiljkovic, I. y Heffron F.** (1994) *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect. Immun.* **62**:1623-1630.
- Behlau, I. y Miller, S. I.** (1993) A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**:4475-4484.
- Belden, W. J. y Miller, S. I.** (1994) Further characterization of the PhoP-regulon: Identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect. Immun.* **62**:5095-5101.
- Benjamin, W. H. Jr., Yother, J., Hall, P. y Briles, D. E.** (1991) The *Salmonella typhimurium* locus *mviA* regulates virulence in *Ity<sup>S</sup>* but not *Ity<sup>r</sup>* mice: functional *mviA* results in avirulence; mutant (nonfunctional) *mviA* results in virulence. *J. Exp. Med.* **174**:1073-1083.
- Bliska, J. B., Clemens, J. C., Dixon, J. E. y Falkow, S.** (1992) The *Yersinia* tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. *J. Exp. Med.* **176**:1625-1630.
- Bliska, J. B. y Falkow, S.** (1993) The role of host tyrosine phosphorylation in bacterial pathogenesis. *Trends in Genetics* **9**: 85-89.
- Bliska, J. B., Galán, J. E. y Falkow, S.** (1993) Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* **73**: 903-920.
- Bolton, P. G. y Dean, C. R.** (1972) Phosphatase synthesis in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* growing in continuous culture. *Biochem. J.* **127**:87-96.

- Bortolussi, R., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Van Asbeck, B. S. y Verhoef, J.** (1987) Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems. *Infect. Immun.* **55**:3197-3203.
- Buchmeier, N. A. y Heffron, F.** (1990) Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**:730-732.
- Buchmeier, N. A. y Heffron, F.** (1991) Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **59**: 2232-2238.
- Budiarti, S., Hirai, Y., Minami, J., Katayama, S., Shimizu, T. y Okabe, A.** (1991) Adherence to Hep-2 cells and replication in macrophages of *Salmonella derby* of human origin. *Microbiol. Immunol.* **35**:111-123.
- Camilli, A., Paynton, C. R. y Portnoy, D. A.** (1989) Intracellular methicillin selection of *Listeria monocytogenes* mutants unable to replicate in a macrophage cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5522-5526.
- Casadaban, M. J. y Cohen, S. N.** (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mu-lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4530-4533.
- Chang, H. R., Vladoianu, I-R. y Pechère, J-C.** (1990) Effects of ampicillin, ceftriaxone, chloramphenicol, pefloxacin and trimethoprim-sulphamethoxazole on *Salmonella typhi* within human monocyte-derived macrophages. *J. Antimicrob. Chemotherapy* **26**: 689-694.

- Chatfield, S. N., Li, J. L., Sydenham, M., Douce, G. y Dougan, G.** (1992) *Salmonella* genetics and vaccine development. En: Molecular Biology of Bacterial Infection: Current Status and Future Perspectives. C. Hormaeche, C. W. Penn y C. J. Smyth (eds.). Society for General Microbiology Symposium Vol.: 49. Cambridge University Press. United Kingdom, 300-312.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. y Ames, B. N.** (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell 41:753-762.
- Clemens, J. C., Guan, K., Bliska, J. B., Falkow, S. y Dixon, J. E.** (1991) Microbial pathogenesis and tyrosine dephosphorylation: surprising "bedfellows". Mol. Microbiol. 5:2617-2620.
- Collins, L. V., Attridge, S. y Hackett, J.** (1991) Mutations at *rfc* or *pmi* attenuate *Salmonella typhimurium* virulence for mice. Infect. Immun. 59:1079-1085.
- Contreras, I., Obreque, V., Tesser, B. y Mora, G. C.** (1994) Mini-Mu technology in *Salmonella typhi*: isolation of stable MudJ operon fusions by *cis* complementation. Biol. Res. 27:233-239.
- Contreras, Y., Obreque, V., Blanco, L. P. y Mora, G. C.** (1995) Anaerobically induced *Salmonella typhi* genes are involved in entry and proliferation within human derived cell lines. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 26(2):110-117.

- Craig, E. A., Gambill, B. D. y Nelson, R. J.** (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**:402-414.
- D'Arcy Hart, P., Armstrong, J. A., Brown, C. A. y Draper, P.** (1972) Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infec. Immun.* **5**:803-808.
- D'Arcy Hart, P., Young, M. R., Gordon A. H. y Sullivan, K. H.** (1987) Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain *Mycobacteria* can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J. Exp. Med.* **166**:933-946.
- Davies, R. L., Parton, R., Coote, J. G., Alison Gibbs, H. y Freer, J. H.** (1992) Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *J. Gen. Microbiol.* **138**:909-922.
- Delves, P. J.** (1994) En: Cellular Immunology. Rickwood, H. (ed.) p:48-49; 59-62; 65-68. LabFax Bios Scientific Publishers. Blackwell Scientific Publications. London.
- Demple, B.** (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Ann. Rev. Genet.* **25**:315-337.
- Dorman, C. J.** (1991) DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infec. Immun.* **59**:745-749.
- Dowling, J. N., Saha, A. K. y Glew, R. H.** (1992) Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol. Rev.* **56**:32-60.

- Edelman, R. y Levine, M. M.** (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Inf. Dis.* **8**:329-349.
- Egawa, K., Klein, T. W., Yamamoto, Y., Newton, C. A. y Friedman, H.** (1992) Cyclic AMP inhibition of lipopolysaccharide-induced restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophage cultures. *Infect. Immun.* **60**:1936-1940.
- Egner, C. y Berg, D. E.** (1981) Excision of transposon Tn5 is dependent on the inverted repeats but not on the transposase function of Tn5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:459-463.
- Ensgraber, M. y Loos, M.** (1992) A 66-Kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun* **60**: 3072-3078.
- Falkow, S.** (1991) Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* **65**:1099-1102.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I.** (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.
- Farr, S. B. y Kogoma, T.** (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. y Heffron, F.** (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5189-5193.
- Fields, P. I., Groisman, E. A. y Heffron, F.** (1989) A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**: 1059-1062.

- Fierer, J., Eckmann, L., Fang, F., Pfeifer, C., Finlay, B. B. y Guiney, D. (1993) Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in culture macrophages and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* **61**:5231-5236.
- Finlay, B. B. y Falkow, S. (1989) *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* **3**: 1833-1841.
- Francis, K. P. y Gallagher, M. P. (1993) Light emission from a *Mudlux* transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogen peroxide and by interaction with mouse macrophage cell line J774.2. *Infect. Immun.* **61**:640-649.
- Frehel, C y Rastogi, N. (1987) *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect. Immun.* **55**:2916-2921.
- Foster, J. W. (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* **173**:6896-6902.
- Foster, J. W. (1993) The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**:1981-1987.
- Foster, J. W. y Bearson, B. (1994) Acid-sensitive mutants of *Salmonella typhimurium* identified through a dinitrophenol lethal screening strategy. *J. Bacteriol.* **176**:2596-2602.
- Foster, J. W., Park, Y. K., Bang, I. S., Karem, K., Betts, H., Hall, K. H. y Shaw, E. (1994) Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **140**:341-352.
- Furman, M., Fica, A., Saxena, M., Di Favio, J. L. y Cabello, F. C. (1994) *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuate in mice. *Infect. Immun.* **62**:4091-4094.

- Galán, J. E. y Curtiss III, R.** (1989) Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microbial. Pathogenesis* **6**:433-443.
- Gordon, A. H., D'Arcy Hart, P. y Young, M. R.** (1980) Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* **286**:79-80.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R. y Armstrong, J. A.** (1976) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:2510-2514.
- Groisman, E. A., Chiao, E., Lipps, C. J. y Heffron, F.** (1989) *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7077-7081.
- Groisman E. y Saier M.** (1990) *Salmonella* virulence new clues to intramacrophage survival. *TIBS* **15**: 30-33.
- Groisman, E. A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M. y Lipps, C. J.** (1992a) Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11939-11943.
- Groisman, E. A., Saier, M. H. Jr. y Ochman, H.** (1992b) Horizontal transfer of a phosphatase gene as evidence for mosaic structure of the *Salmonella* genome. *EMBO J.* **11**:1309-1316.
- Hasset, D. J. y Cohen, M. S.** (1989) Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interactions with phagocytic cells. *FASEB Journal* **3**: 2574-2582.

- Hoffman, C. S. y Wright, A.** (1985) Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: An approach for studying protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5107-5111.
- Hone, D. M., Attridge, S. R., Forrest, B., Morona, R., Daniels, D., LaBrooy, J. T., Bartholomeusz, R. C. A., Shearman, D. J. C. y Hackett, J.** (1988) A *galE* via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect. Immun.* **56**: 1326-1333.
- Horwitz, M. A.** (1983) The Legionnaires' Diseases bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**:2108-2126.
- Jacob-Dubuisson, F., Kuehn, M. y Hultgren, S. J.** (1993) A novel secretion apparatus for the assembly of adhesive bacterial pili. *Trends in Microbiol.* **1**:50-55.
- Janeway, C. A. y Travers, P.** (1994) En: *Immuno Biology. The immune system in health and disease.* Ward, Lawrence (eds.) cap. 7. Current Biology Ltda./Garland Publishing Inc. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. New York.
- Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I. y Hormaeche, C.** (1991) The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* **5**:401-407.
- Kagaya, K., Watanabe, K. y Fukazawa, Y.** (1989) Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect. Immun.* **57**: 609-615.

- Kagaya, K., Miyakawa, Y., Watanabe, K. y Fukazawa, Y.** (1992) Antigenic role of stress-induced catalase of *Salmonella typhimurium* in cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* **60**:1820-1825.
- Kasahara M., Nakata A. y Shinagawa H.** (1991) Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* *phoN* gene, which encodes nonspecific acid phosphatase. *J. Bacteriol.* **173**: 6760-6765.
- Kawaoka, Y., Otsuki, K. y Tsubokura, M.** (1983) Growth temperature-dependent variation in the bacteriophage-inactivating capacity and antigenicity of *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2739-2747.
- Kehoe, M., Sellwood, R., Shipley, P. y Dougan, G.** (1981) Genetic analysis of K88-mediated adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Nature* **291**: 122-126.
- Keyse, S. M. y Emslie, E. A.** (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**:644-647.
- Kier, L. D., Weppelman, R. y Ames, B. N.** (1977) Resolution and purification of three periplasmic phosphatases of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **130**:399-410.
- Kier, L. D., Weppelman, R. M. y Ames, B. N.** (1979) Regulation of nonspecific acid phosphatase in *Salmonella*: *phoN* and *phoP* genes. *J. Bacteriol.* **138**:155-161.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. y Cossart, P.** (1992) *L. monocytogenes*- induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**:521-531.

- Koshland, D. y Botstein, D.** (1980) Secretion of  $\beta$ -lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* **20**:749-760.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leher, R. I., Ganz, T. y Selsted, M. E.** (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **64**:229-230.
- Lett, M., Sasakawa, C., Okada, N., Sakai, T., Makino, S., Yamada, M., Komatsu, K. y Yoshikawa, M.** (1989) *virG*, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the VirG protein and determination of the complete coding sequence. *J. Bacteriol.* **171**:353-359.
- Levine, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E. y Clements, M. L.** (1983) New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* **47**: 510-550.
- Lissner, C. R., Swanson, R. N. y O'Brien, A. D.** (1983) Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in vitro*. *J. Immunol.* **131**:3006-3013.
- Lobos, S. y Mora, G.** (1991) Alterations in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis. *Electrophoresis* **12**: 448-450.

- Lowrie, D. B., Aber, V. R. y Carrol, M. E. W.** (1979) Division and death rates of *Salmonella typhimurium* inside macrophages: use of penicillin as a probe. *J. Gen. Microbiol.* **110**:409-419.
- Mäkelä, P. H., Valtonen, V. V. y Valtonen, M.** (1973) Role of O-antigen (lipopolysaccharide) factors in the virulence of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.* **128**:81-85.
- Maloy, S. R. y Nunn, W. D.** (1981) Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145**:1110-1112.
- Maloy, S. R.** (1990) *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Jones and Bartlett Publishers. Boston.
- Manoil, C. y Beckwith, J.** (1985) *TnphoA*, a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8129-8133.
- Manoil, C., Mekalanos, J. y Beckwith, J.** (1990) Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* **172**: 515-518.
- Mekalanos, J. J.** (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**:1-7.
- Miller, J. H.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Miller, S. I., Kukral, A. M. y Mekalanos, J. J.** (1989) A two-component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5054-5058.

- Miller, S. I. y Mekalanos, J. J.** (1990) Constitutive expression of the PhoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol.* **172**:2485-2490.
- Miller, S. I., Pulkkinen, W. S., Selsted, M. E. y Mekalanos, J. J.** (1990) Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **58**:3706-3710.
- Miller, S. I.** (1991) PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Molec. Microbiol.* **5**:2073-2078.
- Miller, V. L., Beer, K. B., Loomis, W. P., Olson, J. A. y Miller, S. I.** (1992) An unusual *pagC::TnphoA* mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect. Immun.* **60**:3763-3770.
- Mroczenski-Wildey, M. J., Di Fabio, J. L. y Cabello, F. C.** (1989) Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of lipopolysaccharide. *Microbial. Pathogenesis* **6**: 143-152.
- Murray, P. J. y Young, R. A.** (1992) Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. *J. Bacteriol.* **174**:4193-4196.
- Neidhardt, F. C. y VanBogelen, R. A.** (1987) Heat shock response. En F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. Washington DC.

- Ohkuma, S. y Poole, B.** (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3327-3331.
- Pick, U., Bental, M., Chitlaru, E. y Weiss, M.** (1990) Polyphosphate-hydrolysis - a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS* **274**:15-18.
- Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W. y Cossart, P.** (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**:1263-1267.
- Pradel, E. y Schnaitman, C. A.** (1991) Effect of *rfaH* (*sfrB*) and temperature on expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **173**:6428-6431.
- Pulkkinen, W. S. y Miller, S. I.** (1991) A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **173**:86-93.
- Rana, F. R., Macias, E. A., Sultany, C. M., Modzrakowski, M. C. y Blazyk, J.** (1991) Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. *Biochemistry* **30**:5858-5866.
- Ray, M. K., Kumar, G. S. y Shivaji, S.** (1994) Phosphorylation of lipopolysaccharides in the antarctic psychrotroph *Pseudomonas syringae*: a possible role in temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **176**:4243-4249.
- Rubino, S., Leori, G., Rizzu, P., Erre, G. Colombo, M. M., Uzzau, S., Masala, G. y Cappuccinelli, P.** (1993) *TnphoA* *Salmonella abortusovis* mutants unable to adhere to epithelial cells and with reduced virulence in mice. *Infect. Immun.* **61**:1786-1792.

- Saha, A. K., Dowling, J. N., Pasculle, A. W. y Glew, R. H.** (1988) *Legionella micdadei* phosphatase catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in human neutrophils. Arch. Biochem. Biophys. **265**:94-104.
- Saito, S., Shinomiya, H. y Nakano, M.** (1994) Protein phosphorylation in murine peritoneal macrophages induced by infection with *Salmonella* species. Infect. Immun. **62**:1551-1556.
- Salyers, A. A. y Whitt, D. D.** (1994) En: Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. p:231-232. ASM Press Washington D.C.
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T. y Mounier, J.** (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect. Immun. **51**:461-469.
- Sein, J., Cachicas, V., Becker M. I. y De Ioannes, A. E.** (1993) Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol. Res. **26**:53-62.
- Sokolovic, Z. y Goebel, W.** (1989) Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. Infect. Immun. **57**:295-298.
- Sokolovic, Z., Fuchs, A. y Goebel, W.** (1990) Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **58**:3582-3587.
- Sundström, C. y Nilsson, K.** (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int. J. Cancer **17**: 565-577.

- Stinavage, P., Martin, L. E. y Spitznagel, J. K.** (1989) O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to nonoxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* **57**:3894-3900.
- Stinavage, P. S., Martin, L. E. y Spitznagel, J. K.** (1990) A 59 kilodalton outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* protects against oxidative intraleukocytic killing due to human neutrophils. *Mol. Microbiol.* **4**:283-293.
- Straley, S. C., Skrzypek, E., Plano, G. V. y Bliska, J. B.** (1993) Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect. Immun.* **61**:3105-3110.
- Taylor, P. W., Messner, P. y Parton, R.** (1981) Effect of the growth environment on cell-envelope components of *Escherichia coli* in relation to sensitivity to human serum. *J. Med. Microbiol.* **14**:9-19.
- Toro, C., Lobos, S., Calderón, I., Mora, G. y Rodríguez M.** (1990) Clinical isolate of a porinless *S.typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Anti. Agen. and Chem.* **34**:1715- 1719.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
- Uerkvitz, W.** (1988) Periplasmic nonspecific acid phosphatase II from *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* **263**:15823-15830.

- Valone, S. E., Chikami, G. K. y Miller, V. L.** (1993) Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B and -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* **61**:705-713.
- Valtonen, V. V.** (1970) Mouse virulence of *Salmonella* strains: The effect of different smooth-type O side-chains. *J. Gen. Microbiol.* **64**:255-268.
- Van Bogelen, R. A., Kelley, P. M. y Neidhardt, F. C.** (1987) Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:26-32.
- Vladoianu, I. R., Chang, H. R. y Pechère, J-C.** (1990) Expression of host resistance to *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*: bacterial survival within macrophages of murine and human origin. *Microb. Pathogenesis* **8**:83-90.
- Wells, M. Y. y Rikihisa, Y.** (1988) Lack of lysosomal fusion with phasosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D<sub>1</sub> cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infect. Immun.* **56**:3209-3215.
- Wilkinson, R. G., Gemski, P. y Stocker, B. A. D.** (1972) Non-smooth mutants of *Salmonella typhimurium*: differentiation by phage sensitivity and genetic mapping. *J. Gen. Microbiol.* **70**: 527-554.
- Yamamoto, T., Hanawa, T. y Ogata, S.** (1994) Induction of *Yersinia enterocolitica* stress proteins by phagocytosis with macrophage. *Microbiol. Immunol.* **38**:295-300.
- Young, R. A. y Elliott, T. J.** (1989) Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* **59**:5-8.