

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Participación de los factores transcripcionales Fnr y  
ArcA en la dinámica estructural dependiente de  
oxígeno del lipopolisacárido y su impacto sobre la  
virulencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Doctora en Bioquímica por:**

**PAULINA ALEJANDRA FERNÁNDEZ OYARZÚN**

**Directores de Tesis: Dr. Sergio Álvarez Armijo  
Dr. Carlos Santiviago Cid**

**Santiago-CHILE**

**Agosto 2019**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

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

**PAULINA ALEJANDRA FERNÁNDEZ OYARZÚN**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen público rendido el día

\_\_\_\_\_.

**Directores de Tesis:**

**Dr. Sergio Álvarez A.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Santiviago C.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Alfonso Paredes**

\_\_\_\_\_

**Dr. Gino Corsini**

\_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Jerez**

\_\_\_\_\_

**Dr. Juan Carlos Salazar**

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Cumplí doce años y medio como alumna de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y estoy profundamente agradecida de quienes la componen: académicos, funcionarios y estudiantes. En especial, agradezco a la comunidad del tercer piso del edificio Luis Núñez, a los profesores siempre amables, a los tesisistas dispuestos a ayudar y a colaborar, y a los funcionarios con enorme voluntad.

A los laboratorios que contribuyeron a la realización de esta tesis. Al Laboratorio de Biología de Sistemas del Dr. Francisco Chávez por permitirme trabajar con pez cebra y completar el tercer objetivo de mi tesis, y al Laboratorio de Bioquímica del Dr. Mauricio Báez por orientarme y facilitarme el equipamiento para la purificación de proteínas.

A la comisión evaluadora de esta tesis Doctores Alfonso Paredes, Gino Corsini, Carlos Jerez y Juan Carlos Salazar, por su atención en mi tesis, por siempre recalcar el lado positivo y generar instancias de discusión enriquecedoras para mi formación.

A mis compañeros del programa de Doctorado en Bioquímica, Evelyn, Ítalo, Pablo y Cristian por crear un ambiente de apoyo mutuo en lo personal y académico, y siempre optar por el camino del compañerismo.

A mis directores de tesis, Sergio y Cliff, por su dedicación, paciencia y sobretodo, por su comprensión y apoyo en los momentos que se volvieron pesados y difíciles de soportar. Muchas gracias por permitir que LabMicro sea el maravilloso lugar que es.

A LabMicro, mis hermanos, hijos, nietos, mascotas, etc. A Héctor, Andrea, Kamo, Jimmy, Chinchí, Ítalo, Bea, BayBay, Feña, Morgan y Negro, no les quiero agradecer por separado, porque lo más importante de LabMicro para mí es lo que pudimos construir todos juntos, un lugar de verdadero compañerismo (y a veces de bullying). No sé cómo hubiese terminado mi tesis sin su apoyo y amistad. Por lejos, son lo más lindo que me llevo de esta etapa.

Al ejército rojo, a Cony, Héctor (de nuevo), Amparo, Jimmy (de nuevo), Cometa, Chinchí (de nuevo) y Marce por tener la paciencia de entenderme, seguir mi estructura mental y hacer experimentos que muchas veces no resultan.

A mis amigos de vida, Pipe, Pingüino, Johany, Pablo, Claudia, Sebastián, Javi, Eli, y a la más antigua, Maite, por siempre estar conmigo, por el apoyo constante y porque ni las distancias intercontinentales cambian las verdaderas amistades.

A mi familia, repartida de Antofagasta a Punta Arenas, porque siempre nos cuidamos y nos queremos a pesar de que ya no nos vemos todos los días. Y a los que ya no están, por ser mis referentes en muchos aspectos de la vida.

A mis tres pilares fundamentales. A mi papá por siempre creer en mí y aceptarme como soy. A mi mamá por ser mi mejor amiga, mi mayor confidente y la mejor mamá del mundo. Y a Cristian, por apoyarme en todas mis decisiones (incluso en las malas), por tu infinita paciencia y comprensión, y por crecer conmigo estos doce años.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Dr. Sergio A. Álvarez y Dr. Carlos A. Santiviago. Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1130225 del Dr. Álvarez, los proyectos FONDECYT 1140754 y 1171844 del Dr. Santiviago y la beca CONICYT de Doctorado Nacional 21140692.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- Fernández PA, Velásquez F, Garcias-Papayani H, Amaya FA, Ortega J, Gómez S, Santiviago CA, Álvarez SA (2018). **Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability.** *Front Microbiol* 9:1220.
- Silva-Valenzuela CA, Velásquez F, Peñailillo J, Garcias-Papayani H, Fernández P, Tobar P, Contreras I, Santiviago CA, Álvarez SA (2016). **O-antigen chain-length distribution in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is regulated by oxygen availability.** *Biochem Biophys Res Commun* 477(4):563-567.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- **Fnr regulates lipid A modification in *Salmonella* Enteritidis by controlling the expression of genes involved in this process in response to oxygen availability.** Fernández P, Velásquez F, Garcias-Papayani H, Silva CA, Amaya F, Espinoza C, Ortega J, Santiviago CA, Álvarez SA. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Santiago, Chile. Noviembre 2018.
- **Changes in lipid a hydroxylation and *lpxO* expression are regulated by the global regulator Fnr in *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Velásquez F, Ortega J, Silva CA, Garcias H, Amaya F, Santiviago CA, Álvarez SA. 7th Congress of European Microbiologists. Valencia, España. Julio 2017.
- **El factor transcripcional ArcA participa en la regulación oxígeno-dependiente de las modificaciones covalentes del lípido A en *Salmonella* Enteritidis.** Fenández P, Velásquez F, Silva CA, Garcias H, Amaya F, Santiviago CA, Álvarez SA. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Rosario, Argentina. Septiembre 2016.
- **Changes in expression of genes involved in O-Antigen chain-length regulation and lipid A covalent modification are regulated by Fnr in *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Amaya F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez SA. ASM Microbe & ICAAC Congress. Boston, MA, USA. Junio 2016.

## PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- **Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability.** Fernández P, Velásquez F, Ortega J, Garcias H, Amaya F, Silva CA, Santiviago CA, Álvarez SA. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. Noviembre 2017.
- **La expresión de los determinantes de largo de cadena del antígeno O es regulada por Fnr y ArcA en *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Amaya F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez SA. XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. Noviembre 2016.
- **Participación de Fnr en la regulación de la expresión de genes involucrados en la modificación covalente del lípido A-core en *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez AA. XXXVII Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. Diciembre 2015.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> .....</b>	<b>2</b>
I.1.1. Adaptación ambiental de <i>Salmonella</i> y su efecto sobre la virulencia .....	3
I.1.2. Respuesta a variaciones en la disponibilidad de oxígeno y su impacto sobre la virulencia de <i>Salmonella</i> .....	5
I.1.3. Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> en otros modelos biológicos de infección .....	7
<b>I.2. Estructura y biosíntesis del lipopolisacárido de <i>Salmonella</i> .....</b>	<b>9</b>
I.2.1. Modificación del LPS y su impacto sobre la virulencia de <i>Salmonella</i> ..	11
I.2.2. Reconocimiento del lipopolisacárido de <i>Salmonella</i> en <i>Danio rerio</i> .....	14
I.2.3. Regulación ambiental de la estructura del lípido A de <i>Salmonella</i> .....	15
I.2.4. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la estructura del lipopolisacárido .....	16
<b>I.3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>I.4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>20</b>
<b>I.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>20</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1. Reactivos .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2. Cepas bacterianas .....</b>	<b>23</b>
<b>II.3. Plasmidios .....</b>	<b>24</b>
<b>II.4. Partidores .....</b>	<b>25</b>
<b>II.5. Medios y condiciones de cultivo bacterianos .....</b>	<b>27</b>
<b>II.6. Identificación serológica de las cepas de <i>S. Enteritidis</i> mediante ensayos de aglutinación .....</b>	<b>28</b>
<b>II.7. Purificación y análisis de ácidos nucleicos .....</b>	<b>28</b>
<b>II.8. Transformación por electroporación con plasmidios o productos de PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>II.9. Obtención de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 .....</b>	<b>30</b>
II.9.1. Obtención de productos de PCR .....	30
II.9.2. Mutagénesis por remplazo alélico .....	31



II.9.3. Movilización de los alelos mutantes por transducción .....	32
II.9.4. Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia .....	33
<b>II.10. Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras .....</b>	<b>34</b>
<b>II.11. Reinserción de alelos en el cromosoma de <i>S. Enteritidis</i> con plasmidios derivados de pWRK-Cam .....</b>	<b>34</b>
II.11.1. Inserción de mutaciones puntuales por <i>overlap extension</i> PCR .....	35
II.11.2. Clonamiento en el vector pGEM-T Easy .....	37
II.11.3. Subclonamiento en vector pWRK-Cam .....	39
II.11.4. Transformación e inserción de los plasmidios pWRK en el genoma de <i>S. Enteritidis</i> .....	40
II.11.5. Confirmación de la introducción de las mutaciones puntuales en el promotor de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> .....	41
<b>II.12. Construcciones de fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>II.13. Ensayos enzimáticos de <math>\beta</math>-galactosidasa en cultivos de <i>S. Enteritidis</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>II.14. Análisis de la unión de ArcA y FnrD154A a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i> .....</b>	<b>43</b>
II.14.1. Amplificación de las regiones promotoras .....	44
II.14.2. Obtención de las proteínas recombinantes ArcA y FnrD154A .....	44
II.14.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	47
II.14.4. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) .....	47
<b>II.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida de LPS .....</b>	<b>48</b>
<b>II.16. Ensayos de infección de <i>Danio rerio</i> con cepas de <i>S. Enteritidis</i> mediante inmersión estática .....</b>	<b>49</b>
II.16.1. Mantenimiento de las larvas de pez cebra .....	50
II.16.2. Infección de larvas de pez cebra mediante inmersión estática .....	50
<b>II.17. Análisis estadístico .....</b>	<b>51</b>
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>III.1. La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS presentan sitios de unión funcionales a ArcA y Fnr .....</b>	<b>52</b>
III.1.1. Análisis bioinformáticos revelan que existen sitios hipotéticos de unión a ArcA y Fnr en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i> .....	52
III.1.2. ArcA fosforilado y FnrD154A se unen a las regiones promotoras de genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS <i>in vitro</i> .....	54
<b>III.2. Construcción de mutantes regulatorias en <i>S. Enteritidis</i> .....</b>	<b>62</b>
III.2.1. Selección de los genes involucrados en la dinámica estructural del LPS sobre los cuales se construyeron las mutantes regulatorias de <i>S. Enteritidis</i> .....	62
III.2.2. La regulación oxígeno dependiente de la expresión de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> es modulada por ArcA en <i>S. Enteritidis</i> .....	63

III.2.3. Selección de las mutaciones puntuales a generar en los promotores de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en <i>S. Enteritidis</i> .....	64
<b>III.3. La mutación puntual de los ABS presentes en la región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> disminuye la afinidad de los promotores por ArcA-P66</b>	
<b>III.4. Ensayos de infección de larvas de pez cebra con cepas de <i>S. Enteritidis</i></b>	71
III.4.1. La inactivación del gen <i>lpxO</i> en <i>S. Enteritidis</i> genera un fenotipo hipervirulento durante la infección en <i>Danio rerio</i> .....	72
III.4.2. La inactivación del gen <i>pagP</i> en <i>S. Enteritidis</i> genera un fenotipo atenuado durante la infección de larvas de <i>Danio rerio</i> .....	76
III.4.3. La mutante regulatoria atenuada <i>S. Enteritidis</i> $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ carece de lípido A heptaacilado debido a la inactivación del promotor del gen <i>pagP</i> .....	80
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	84
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>VI. REFERENCIAS</b> .....	94
<b>ANEXO 1. ArcA y FnrD154A se unen a las regiones promotoras de genes de <i>S. Enteritidis</i> involucrados en la síntesis y modificación del LPS</b> .....	104
<b>ANEXO 2. Construcción de mutantes regulatorias en los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i></b> .....	107
<b>A2.1. Construcción de vectores pWRK que contienen alelos intactos o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i></b> .....	108
A2.1.1. Generación de mutaciones puntuales en los promotores de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> mediante <i>overlap extension</i> PCR .....	108
A2.1.2. Clonamiento de los alelos intactos o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en pGEM-T Easy .....	110
A2.1.3. Subclonamiento de los alelos silvestres o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en pWRK Cam .....	111
<b>A2.2. Reinserción en <i>cis</i> de los alelos silvestres y mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en mutantes <math>\Delta lpxO</math> y <math>\Delta pagP</math> de <i>S. Enteritidis</i></b> .....	112
A2.2.1. Generación de mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de <i>S. Enteritidis</i> por reemplazo alélico .....	112
A2.2.2. Inserción cromosomal de los plasmidios pWRK en las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de <i>S. Enteritidis</i> .....	113

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis .....	23
<b>Tabla 2.</b> Plasmidios utilizados en esta tesis .....	24
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados en esta tesis .....	25
<b>Tabla 4.</b> Índice del estado fisiológico de larvas de <i>Danio rerio</i> durante la infección con cepas de <i>S. Enteritidis</i> .....	51
<b>Tabla 5.</b> ABS y FBS hipotéticos identificados en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS .....	54
<b>Tabla 6.</b> Supervivencia de larvas de <i>Danio rerio</i> infectadas con cepas de <i>S. Enteritidis</i> ...	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del lipopolisacárido (LPS) de <i>S. Enteritidis</i> .....	10
<b>Figura 2.</b> Modificación covalente del lípido A de <i>Salmonella</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> La disponibilidad de oxígeno modula la hidroxilación del lípido A y la expresión de <i>lpxO</i> en <i>S. Enteritidis</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema general de la estrategia de inserción de alelos en el cromosoma de <i>S. Enteritidis</i> con plasmidios derivados de pWRK-Cam .....	36
<b>Figura 5.</b> Esquema de introducción de mutaciones puntuales mediante <i>overlap extension</i> PCR .....	38
<b>Figura 6.</b> La región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> contienen ABS y FBS hipotéticos .....	53
<b>Figura 7.</b> ArcA-P se une a la región promotora del gen <i>lpxO</i> <i>in vitro</i> .....	56
<b>Figura 8.</b> ArcA-P se une a la región promotora del gen <i>pagP</i> <i>in vitro</i> .....	57
<b>Figura 9.</b> FnrD154A se une a la región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> <i>in vitro</i> .....	58
<b>Figura 10.</b> ArcA-P se une a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i> .....	60
<b>Figura 11.</b> FnrD154A se une a la región promotora de genes de <i>S. Enteritidis</i> involucrados en la dinámica estructural del LPS .....	61
<b>Figura 12.</b> ArcA participa en la regulación de la expresión de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> dependiente de oxígeno en <i>S. Enteritidis</i> .....	65
<b>Figura 13.</b> Las mutaciones puntuales en L-ABS1 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen <i>lpxO</i> y ArcA-P <i>in vitro</i> .....	68
<b>Figura 14.</b> Las mutaciones puntuales en P-ABS2 y P-ABS3 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen <i>pagP</i> y ArcA-P <i>in vitro</i> .....	70
<b>Figura 15.</b> Ensayo preliminar de infección de larvas de pez cebra con cepas de <i>S. Enteritidis</i> .....	73
<b>Figura 16.</b> La cepa <i>S. Enteritidis</i> $\Delta$ <i>lpxO</i> /pWRK-P <sub>x</sub> - <i>lpxO</i> carece de antígeno O .....	76
<b>Figura 17.</b> La mutante $\Delta$ <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i> y la mutante regulatoria para el mismo gen presentan un fenotipo atenuado en ensayos de infección de larvas de pez cebra ...	79
<b>Figura 18.</b> La cepa <i>S. Enteritidis</i> $\Delta$ <i>pagP</i> /pWRK-P <sub>xx</sub> - <i>pagP</i> no expresa <i>pagP</i> .....	83
<b>Figura 19.</b> La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i> contienen ABS y FBS hipotéticos .....	105
<b>Figura 20.</b> Generación de mutaciones puntuales en L-ABS1 en el promotor del gen <i>lpxO</i> .....	109
<b>Figura 21.</b> Generación de mutaciones puntuales en P-ABS2 y P-ABS3 en el promotor del gen <i>pagP</i> .....	110
<b>Figura 22.</b> Construcción de vectores derivados de pWRK-Cam que contienen alelos silvestres o mutados de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i> .....	112
<b>Figura 23.</b> Reinserción <i>in cis</i> de alelos silvestres y mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en mutantes $\Delta$ <i>lpxO</i> y $\Delta$ <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i> .....	114

## ABREVIATURAS

<b>A/BA:</b>	Acrilamida/Bisacrilamida
<b>ABS:</b>	Sitio de unión a ArcA
<b>AgO:</b>	Antígeno O
<b>Amp:</b>	Ampicilina
<b>ArcA-P:</b>	ArcA fosforilado
<b>bp:</b>	Pares de bases
<b>Cam:</b>	Cloranfenicol
<b>CAMP:</b>	Péptido catiónico antimicrobiano
<b>DO<sub>600</sub>:</b>	Densidad óptica medida a 600 nm
<b>dNTP:</b>	Desoxinucleotido trifosfato
<b>dpf:</b>	Días post fertilización
<b>dpi:</b>	Días post infección
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMSA:</b>	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
<b>FBS:</b>	Sitio de unión a Fnr
<b>g:</b>	Aceleración de gravedad
<b>hpi:</b>	Horas post infección
<b>IPEF</b>	Índice promedio del estado fisiológico
<b>kV:</b>	Kilo Volts
<b>LB:</b>	Medio Luria Bertani
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido
<b>MME:</b>	Medio mínimo E
<b>ONPG:</b>	2-nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PSA:</b>	Persulfato de amonio
<b>SAP:</b>	Fosfatasa alcalina de camarón
<b>SCV:</b>	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
<b>SDS:</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SPI:</b>	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
<b>TAE:</b>	Amortiguador Tris-ácido acético-EDTA
<b>TBE:</b>	Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA
<b>TEMED:</b>	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

**TLR:** Receptor tipo Toll  
**UFC:** Unidad formadora de colonia  
**UV:** Ultravioleta

## RESUMEN

El lipopolisacárido (LPS) es el mayor componente de la superficie de bacterias Gram negativo y un importante mediador de las interacciones con el hospedero durante el ciclo infeccioso de bacterias patógenas. Tres dominios componen el LPS: el antígeno O (AgO), el *core* u oligosacárido central y el lípido A. Todos los dominios del LPS pueden sufrir modificaciones en respuesta a estímulos ambientales, sin embargo las modificaciones realizadas sobre el lípido A son las mayormente estudiadas debido a su impacto sobre la virulencia de bacterias patógenas. Por ejemplo, se ha establecido que estas modificaciones pueden aumentar la resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos producidos por el hospedero y ayudan a evadir el reconocimiento del lípido A por los receptores TLR4.

Durante su ciclo infeccioso, *Salmonella* se ve enfrentada a distintas condiciones ambientales a las cuales se debe adaptar mediante la regulación de la expresión de sus genes. Se ha evidenciado que en condiciones que simulan el interior de la vacuola contenedora de *Salmonella*, esta bacteria altera la expresión de genes involucrados en la modificación del lípido A con el objetivo incrementar su supervivencia dentro de este compartimiento. No obstante, la regulación de la expresión de estos genes bajo otras condiciones que enfrenta *Salmonella* durante su ciclo infeccioso aún no ha sido estudiada. Dentro de este contexto, en el lumen intestinal *Salmonella* se debe adaptar a una disminución progresiva en la tensión de oxígeno. Para eso, esta bacteria cuenta con varios sensores que reconocen estos estímulos ambientales, los que a su vez activan a los reguladores de respuesta encargados de modificar la expresión de genes para adaptarse a esta condición. Tal es el caso del regulador global de respuesta Fnr y del sistema de dos componentes ArcA/ArcB.

Previamente, en nuestro laboratorio se demostró por análisis de qRT-PCR que varios genes involucrados en la modificación del lípido A son regulados por la disponibilidad de oxígeno en forma dependiente de Fnr. En concordancia con los antecedentes expuestos, este trabajo de tesis tuvo como objetivo principal determinar el rol de los factores transcripcionales Fnr y ArcA sobre los cambios en la estructura del LPS y el lípido A en respuesta a las variaciones en la disponibilidad de oxígeno y evaluar el efecto de esta respuesta sobre la virulencia de *S. Enteritidis* en *Danio rerio* (pez cebra). Más específicamente, se evaluó el efecto de la regulación oxígeno-dependiente ejercida por ArcA sobre la expresión de los genes *lpxO* y *pagP*. El gen *lpxO* codifica la dioxigenasa LpxO

que hidroxila una cadena secundaria del lípido A de *Salmonella*, mientras que *pagP* codifica la palmitoil transferasa PagP, encargada de la acilación secundaria del lípido A. Estas modificaciones son relevantes dentro del ciclo infeccioso de *Salmonella*, ya que disminuyen la capacidad del lípido A de activar la respuesta inflamatoria en macrófagos. Sumado a lo anterior, se escogió estudiar estas modificaciones debido a que la expresión de los genes *lpxO* y *pagP* es regulada por la disponibilidad de oxígeno y, además, las especies hidroxiladas y/o palmitoiladas de lípido A ya habían sido identificadas en *S. Enteritidis*.

En este trabajo de tesis se determinó, mediante la construcción de fusiones transcripcionales, que ArcA reprime la expresión de los genes *lpxO* y *pagP* en condiciones anaeróbicas de crecimiento, mientras que Fnr también reprime la expresión de *lpxO* bajo las mismas condiciones. En el caso de la regulación ejercida por ArcA, se demostró que esta regulación es directa ya que se predijo la existencia de tres sitios de unión a ArcA (ABS) en el promotor de estos genes, los cuales tienen la capacidad de unirse *in vitro* a ArcA fosforilada (ArcA-P). Además, mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética, se logró identificar los ABS principalmente responsables de esta interacción. La mutación puntual de estos ABS redujo la afinidad del promotor de *lpxO* por ArcA-P *in vitro*. Esta es la primera evidencia que demuestra que ArcA regula directamente la expresión de genes involucrados en la modificación del lípido A de *Salmonella* en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.

Con el objetivo de evaluar el impacto de esta regulación sobre la producción de LPS y la virulencia de *S. Enteritidis*, se construyeron mutantes por delección génica de *lpxO* y *pagP* y además, se generaron mutantes regulatorias de los mismos genes que presentaban mutaciones puntuales en los ABS de sus promotores. Si bien se construyeron las mutantes regulatorias, éstas no pudieron ser utilizadas por diferentes razones. Por un lado, por razones que desconocemos la mutante regulatoria del gen *lpxO* no presentaba AgO, mientras que la mutante regulatoria del gen *pagP* presentaba inactivación de su promotor. Independiente a los problemas mencionados, se realizaron ensayos de infección por inmersión estática en pez cebra con cepas de *S. Enteritidis*. Así, se demostró que una mutante que carece del gen *pagP* presenta un fenotipo atenuado de virulencia cuando se compara con la cepa silvestre. Por otra parte, los resultados también indican que una mutante carente del gen *lpxO* presenta un fenotipo más virulento en comparación con la cepa silvestre. Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se evalúa el impacto de las modificaciones del lípido A sobre la virulencia de *Salmonella* en *Danio rerio*.



## ABSTRACT

### **Role of transcriptional factors Fnr and ArcA in the oxygen-dependent regulation of lipopolysaccharide structural dynamics and its impact on the virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**

Lipopolysaccharide (LPS) is the major component of the surface in Gram-negative bacteria and it is an important mediator of the interactions with the host during the infective cycle of pathogenic bacteria. LPS is composed by three domains: O antigen (OAg), core oligosaccharide and lipid A. All LPS domains can undergo modifications in response to environmental cues, however, lipid A modifications are the most studied because of their impact on the virulence of pathogenic bacteria. For instance, it has been established that these modifications can increase resistance to cationic antimicrobial peptides produced by the host, and also help to evade lipid A recognition by TLR4 receptors.

During its infective cycle, *Salmonella* is faced with different environmental conditions to which it must adapt by regulating the expression of its genes. It has been shown that under conditions that mimic the interior of the *Salmonella*-containing vacuole, this bacterium changes the expression of genes involved in lipid A modification, with the aim of increasing its survival within this compartment. However, the regulation of the expression of these genes under other conditions that *Salmonella* encounters during its infective cycle has not been studied. Within this context, inside intestinal lumen *Salmonella* must adapt to the progressive decrease in oxygen tension. For this, this bacterium has several sensors that recognize these stimuli and activate response regulators which are in charge of modifying the expression of genes in order to adapt to this condition. Such is the case of the global response regulator Fnr and the ArcA/ArcB two-component system.

Previously in our laboratory it was demonstrated, by qRT-PCR analysis, that several genes involved in the lipid A modification are regulated by oxygen availability in an Fnr-dependent manner. In agreement with the evidence presented above, the main objective of this thesis was to determine the role of the transcriptional factors Fnr and ArcA on the changes in the structure of LPS and lipid A in response to changes in oxygen availability, and to evaluate the effect of this response on the virulence of *S. Enteritidis* in *Danio rerio* (zebrafish) alternative model. More specifically, we evaluated the effect of oxygen-dependent regulation exerted by ArcA on the expression of *lpxO* and *pagP* genes. *lpxO* gene encodes the dioxygenase LpxO that hydroxylates a secondary acyl chain of lipid A in *Salmonella*, while *pagP* encodes the palmitoyl transferase PagP, responsible for the secondary acylation of lipid A. These modifications are relevant during *Salmonella* infective

cycle, as they decrease lipid A ability to activate the inflammatory response within macrophages. In addition, we chose to study these modifications because *lpxO* and *pagP* expression is regulated by oxygen availability, and also, hydroxylated and/or palmitoylated lipid A species have been previously identified in *S. Enteritidis*.

In this thesis, by the construction and analysis of transcriptional fusions it was determined that ArcA represses the expression of the *lpxO* and *pagP* genes in anaerobic growth conditions, while Fnr also represses the expression of the *lpxO* under the same growth conditions. In the case of the regulation exerted by ArcA, it was also shown that this regulation is direct, since the promoters of these genes have three putative ArcA binding sites (ABS) each and they are able to bind to phosphorylated ArcA (ArcA-P) *in vitro*. Also, by electrophoretic mobility shift assays, the ABS mainly responsible for these interactions were identified. Point-mutation of these ABS reduced the affinity of the promoters for ArcA-P *in vitro*. This is the first evidence describing that ArcA directly regulates the expression of genes involved lipid A modification in response to oxygen availability in *Salmonella*.

In order to evaluate the impact of this regulation on LPS production and on the virulence of *S. Enteritidis*, *lpxO* and *pagP* deletion mutants were constructed and also, regulatory mutants for the same genes, which had point-mutations in the ABS of their promoters, were generated. Although these regulatory mutants were constructed, they could not be used because of different reasons. On one hand, for unknown reasons the *lpxO* regulatory mutant did not present OAg, whereas the *pagP* regulatory mutant had an inactive promoter. Despite of the aforementioned problems, infection assays by static immersion were carried out in zebrafish with *S. Enteritidis* strains. Thus, it was shown that a mutant lacking the *pagP* gene has an attenuated virulence phenotype when compared to a strain with a wild-type phenotype. Otherwise, the results also indicate that a mutant lacking the *lpxO* gene has an enhanced virulent phenotype when compared with the wild-type strain. To our knowledge, this is the first report on the impact of lipid A modifications on *Salmonella* virulence using the *Danio rerio* model.

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* está constituido por dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última incluye más de 2500 serovares capaces de producir una variedad de enfermedades tanto en el ser humano como en otros vertebrados (Brenner *et al.*, 2000). Dentro de los serovares que conforman la especie *S. enterica*, *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), son los más estudiados debido al alto impacto que provocan sobre la salud pública (Roberts & Sockett, 1994).

De los serovares previamente mencionados, *S. Typhi* es un patógeno altamente adaptado a un hospedero específico, el ser humano, siendo capaz de producir una infección sistémica en él (Santos *et al.*, 2001). Por otra parte, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* tienen la capacidad de infectar a un amplio rango de hospederos, incluyendo al ser humano. Particularmente, *S. Enteritidis* tiene la capacidad de establecer una infección sistémica asintomática en aves de corral, mientras que en roedores la colonización sistémica genera un cuadro similar a la fiebre tifoidea en humanos. Por otra parte, la manifestación clínica más común de la infección por *S. Enteritidis* en humanos inmunocompetentes es la gastroenteritis (Guard-Petter, 2001). Así, el tipo de enfermedad producida no depende exclusivamente del serovar de *Salmonella*, sino también del hospedero infectado y su estado inmunológico (Galán, 1999; Blanc-Potard *et al.*, 1999). Cabe destacar que *S. Enteritidis* es considerada la primera causa de salmonelosis transmitida por los alimentos a nivel mundial (Roberts & Sockett, 1994; Guard-Petter, 2001).

## **I.1. Patogenia de la infección por *Salmonella***

El ciclo infeccioso de *Salmonella* se inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados con la bacteria. Una vez ingerida, alcanza el estómago de su hospedero donde es capaz de resistir el pH ácido y dirigirse al intestino delgado (García-del Portillo *et al.*, 1993). En la porción distal del íleo, *Salmonella* es capaz de atravesar la barrera epitelial mediante diversos mecanismos y alcanzar el subepitelio donde es reconocida y fagocitada principalmente por macrófagos (Vásquez-Torres *et al.*, 1999). En humanos, el reconocimiento de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* por macrófagos induce la expresión de genes proinflamatorios que producen un infiltrado rápido de polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (Rosenberger *et al.*, 2000; Nau *et al.*, 2003). Esta respuesta inflamatoria permite la eliminación de la bacteria y conlleva la necrosis de la mucosa apical, lo que finalmente desencadena la diarrea inflamatoria (Raffatellu *et al.*, 2006).

Si la infección es de carácter sistémico, como en el caso de *S. Typhi* en humanos y de *S. Enteritidis* en roedores, la bacteria es capaz de sobrevivir y proliferar en los macrófagos dentro de compartimientos vacuolares denominados “vacuolas contenedoras de *Salmonella*” (SCV), para lo cual regula varias de las funciones de la célula hospedero. Así, la bacteria es llevada por los macrófagos hasta los nódulos linfáticos mesentéricos, donde se multiplica activamente y entra a la circulación, diseminándose por todo el organismo (Everest *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que los mecanismos de infección utilizados por *S. Enteritidis* aún no se comprenden a cabalidad; sin embargo, se propone que son similares a los utilizados por *S. Typhimurium*.

### **I.1.1. Adaptación ambiental de *Salmonella* y su efecto sobre la virulencia**

Durante su ciclo infeccioso *Salmonella* debe sobrellevar el pH ácido del estómago, enfrentar una baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad en el lumen intestinal, y un pH moderadamente ácido, baja disponibilidad de cationes divalentes y presencia de péptidos catiónicos antimicrobianos dentro de la SCV. *Salmonella*, así como otras enterobacterias, es capaz de detectar estos estímulos ambientales y responder a ellos modificando la expresión de genes involucrados en su metabolismo y respuesta a estrés (Haraga *et al.*, 2008). Para esto, la bacteria cuenta con diversos reguladores globales de respuesta, entre los cuales se encuentran factores sigma alternativos, factores transcripcionales y sistemas de dos componentes (Soncini & Groisman, 1996). Se ha establecido que estos reguladores no sólo modulan la expresión de genes involucrados en la supervivencia de *Salmonella*, sino que también controlan la expresión de genes relativos a su virulencia, lo cual le permite llevar a cabo exitosamente la colonización del hospedero (revisado en Hébrard *et al.*, 2011).

Por ejemplo, el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ responde a estímulos ambientales que *Salmonella* enfrenta dentro de la SCV, como la disminución de la concentración de cationes divalentes (García Véscovi *et al.*, 1996) y la presencia de péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMP) (Shprung *et al.*, 2012). El regulador de respuesta PhoP regula la expresión de más de 200 genes en *Salmonella*, muchos de los cuales son relevantes para la virulencia de la bacteria (Prost *et al.*, 2007), ya que algunos de éstos están involucrados en la supervivencia de la bacteria al interior de macrófagos y en la resistencia a CAMP (Groisman, 2001; Prost *et al.*, 2007). Cabe destacar que el sistema PhoP/PhoQ modula la actividad de otro sistema de dos componentes, PmrA/PmrB, el cual es reconocido como el principal modulador de la resistencia a CAMP en *S. Typhimurium*, ya que controla la expresión de genes involucrados en la modificación del

lipopolisacárido (LPS) (Gunn & Miller, 1996), proceso que se discutirá más adelante. Si bien el sensor PmrB se activa en condiciones de alta concentración de cationes trivalentes,  $Fe^{3+}$  y  $Al^{3+}$  (Nishino *et al.*, 2006), también es activado por PhoP/PhoQ a través de la proteína PmrD que estabiliza a PmrA, promoviendo su actividad (Kato & Groisman, 2004).

Por otra parte, dentro del lumen intestinal *Salmonella* enfrenta dos grandes desafíos ambientales: alta osmolaridad y una disminución progresiva de la tensión de oxígeno. Dentro de este contexto, el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR responde principalmente a variaciones en la osmolaridad extracelular, regulando la expresión de proteínas de membrana externa, como porinas (Wang *et al.*, 2012). No obstante, este sistema también es necesario para establecer la infección de *S. Typhimurium* en modelo murino (Dorman *et al.*, 1989) y es capaz de regular indirectamente la expresión de genes pertenecientes a las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 (Lee *et al.*, 2000; Ellermeier & Slauch, 2007).

En bacterias, la adaptación a la transición desde un ambiente aeróbico a uno anaeróbico es regulado principalmente por el factor transcripcional Fnr y el sistema de dos componentes ArcA/ArcB (Kiley & Beinert, 1998; Sawers, 1999; Fink *et al.*, 2007; Ravcheev *et al.*, 2007). Ambos regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético; sin embargo, también controlan la expresión de genes implicados en la virulencia de *Salmonella* (Shalel *et al.*, 2005). Por ejemplo, Fnr está involucrado en la expresión de genes pertenecientes a SPI-1 y al operón de virulencia *srfABC* en *S. Typhimurium*, por lo cual es reconocido como un regulador global de la virulencia en esta bacteria. Es más, una mutante  $\Delta fnr$  de *S. Typhimurium* resulta completamente atenuada en un modelo murino de infección (Fink *et al.*, 2007). Por su parte, ArcA regula la expresión de genes pertenecientes a SPI-2 y SPI-3 (Evans *et al.*, 2011). Si bien se ha evidenciado que mutantes  $\Delta arcA$  de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* no son atenuadas en

modelos de infección murino (Lu *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2011), *S. Enteritidis*  $\Delta$ *arcA* es defectuosa en el establecimiento de la colonización sistémica en el mismo modelo de infección (Silva *et al.*, 2012).

A partir de los antecedentes expuestos, se desprende que los cambios ambientales a los que se enfrenta *Salmonella* durante su ciclo infeccioso producen alteraciones en la expresión de sus genes, lo que incide directamente sobre la virulencia de la bacteria.

### **I.1.2. Respuesta a variaciones en la disponibilidad de oxígeno y su impacto sobre la virulencia de *Salmonella***

En las diferentes etapas de su ciclo infeccioso, *Salmonella* enfrenta variaciones en la disponibilidad de oxígeno. Por una parte, la disponibilidad de oxígeno disminuye en forma progresiva desde el ambiente externo hasta el intestino del hospedero, llegando a ser prácticamente nula en la sangre (Rychlik & Barrow, 2005). La adaptación desde un ambiente aeróbico a uno anaeróbico repercute directamente sobre la virulencia de la bacteria, ya que se ha demostrado que *S. Typhimurium* crecida bajo condiciones limitantes de oxígeno tiene una mayor capacidad invasiva y, además, presenta una mayor adherencia a células epiteliales de mamíferos (Lee & Falkow, 1990). Por otra parte, se ha descrito que *S. Typhi* crecida anaeróbicamente presenta una mayor capacidad de invasión y proliferación en células Hep-2 (Contreras *et al.*, 1995) y que mutantes defectuosas en respiración anaeróbica presentan una menor capacidad de invasión (Contreras *et al.*, 1997). Estos antecedentes indican que la disponibilidad de oxígeno es un aspecto clave que incide sobre la virulencia de *Salmonella*.

Como se mencionó en la sección anterior, Fnr y ArcA/ArcB son los principales responsables de la respuesta de adaptación de *Salmonella* a la baja tensión de oxígeno.

Fnr es un factor transcripcional que cuenta con un centro de  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  en su dominio N-terminal y un dominio C-terminal de unión a DNA. El centro  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  se oxida en presencia de oxígeno a  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ , lo que produce la monomerización e inactivación de Fnr. En ausencia de oxígeno, el centro  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  de Fnr permanece reducido, lo que permite su dimerización y activación (Gunsalus, 1992; Becker *et al.*, 1996; Green & Paget, 2004). En su estado activo, Fnr regula la expresión de genes mediante su unión directa a sus regiones promotoras en secuencias específicas, denominadas sitios de unión a Fnr (FBS), las cuales han sido caracterizadas en *S. Typhimurium* (Fink *et al.*, 2007).

Por su parte, ArcA/ArcB es un sistema de dos componentes donde ArcB es un sensor histidina quinasa y ArcA es el regulador de respuesta (Iuchi & Lin 1988; Iuchi *et al.*, 1990). ArcB es una proteína de membrana que detecta el estado redox del *pool* de quinonas, las cuales, son indicadoras de las condiciones de respiración (Green & Paget, 2004). ArcB se activa por dimerización y autofosforilación, para después transfosforilar y activar al factor transcripcional ArcA (Iuchi *et al.*, 1990). ArcA es una proteína citoplasmática cuyo dominio N-terminal tiene un residuo de Asp conservado fosforilable y un dominio hélice-giro-hélice de unión a DNA en el C-terminal (Iuchi & Lin 1988). En su estado activo, ArcA forma un octámero (constituido por cuatro subunidades fosforiladas y cuatro desfosforiladas) que se une a secuencias específicas en el promotor de los genes pertenecientes a su regulón (Jeon *et al.*, 2001). Estas secuencias se denominan sitios de unión a ArcA (ABS) y han sido caracterizadas en *S. Typhimurium* (Evans *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que Fnr y ArcA, por lo general, trabajan en conjunto regulando la transición aerobiosis-anaerobiosis, ya que se ha evidenciado que varios genes presentan simultáneamente FBS y ABS en su región promotora y, por lo tanto, su expresión es regulada por ambos factores transcripcionales (Compan & Touati, 1994; Ravcheev *et*



*al.*, 2007). Además, Fnr activa la expresión de *arcA* alterando la expresión de genes en forma indirecta a través de este mecanismo (Fink *et al.*, 2007).

Así, los cambios en las condiciones ambientales que debe sobrellevar *Salmonella* durante su ciclo infeccioso, como es el paso desde un ambiente aeróbico a uno anaeróbico, son aprovechados por la bacteria para también alterar la expresión de sus genes de virulencia, lo que le permite llevar a cabo eficientemente la infección. Dentro de este contexto, el LPS es un importante factor de virulencia de bacterias Gram negativo y la principal interface entre el medio intracelular de la bacteria y el medio externo, por lo que esta molécula es ampliamente afectada por las condiciones ambientales que enfrentan las bacterias (Raetz & Whitfield, 2002).

### **I.1.3. Patogenia de la infección por *Salmonella* en otros modelos biológicos de infección**

En los últimos años se ha observado un aumento en la cantidad de estudios que utilizan hospederos alternativos como modelo para el estudio de patógenos, entre los que se encuentran protozoos, nemátodos, insectos y peces (Irazoqui & Urbach, 2010; Coombes & Robey, 2010). Dentro de este contexto surge *Danio rerio* (pez cebra) como modelo de hospedero, el cual ofrece diversas ventajas sobre los modelos clásicos. El pez cebra es un organismo vertebrado pequeño, que es transparente en sus primeros días de vida y que además puede ser fertilizado en forma externa (Kanter & Rawls, 2010; Tobin *et al.*, 2012). Una de las principales razones por las cuales el pez cebra surge como un modelo alternativo adecuado para el estudio de la interacción patógeno-hospedero es que presenta tanto sistema inmune innato como adaptativo. Es más, en este modelo se puede estudiar la respuesta del sistema inmune innato sin involucrar las reacciones del sistema inmune adaptativo, ya que el sistema innato es capaz de responder a infecciones con patógenos

desde el primer día post fertilización (dpf), mientras que el sistema adaptativo alcanza su desarrollo a los 20 dpf (Herbomel *et al.*, 1999; Le Guyader *et al.*, 2008). Es importante mencionar que la administración de patógenos en este modelo se realiza principalmente por microinyección o por inmersión estática (van der Sar *et al.*, 2003; Varas *et al.*, 2017a & 2017b). Esta última consiste en la infección no invasiva de larvas mediante su inmersión en una suspensión de bacterias y refleja condiciones de infección similares a las que ocurren naturalmente (Trede *et al.*, 2004).

Existen estudios donde se ha determinado que *S. Typhimurium* es capaz de infectar pez cebra, ya que la administración de una cepa silvestre por microinyección produce la muerte del pez (van der Sar *et al.*, 2003; Varas *et al.*, 2017a). Interesantemente, la administración a través la misma vía de una mutante  $\Delta$ *aroA* de *S. Typhimurium* (la cual es atenuada en modelos clásicos de hospedero) presenta menor colonización del intestino, no produce mortalidad en los peces y es eliminada del organismo luego de 28 h post infección (Varas *et al.*, 2017a). Es relevante mencionar que, al igual que en modelos clásicos, *S. Typhimurium* es capaz de residir y multiplicarse en el interior de células tipo macrófagos y células epiteliales de pez cebra (van der Sar *et al.*, 2003). También se ha evidenciado que *S. Typhimurium* es capaz de infectar larvas de pez cebra mediante inmersión estática, siendo capaz de colonizar el intestino del pez y generar inflamación de su cloaca. En este caso, se ha reportado que al tercer día post infección (dpi) se observa reclutamiento de neutrófilos en la zona anal, produciendo un síndrome similar al de cloacitis (Varas *et al.*, 2017b).

Si bien los mecanismos por los cuales *Salmonella* es capaz de infectar a pez cebra no son completamente conocidos, este modelo parece adecuado para el estudio de la interacción patógeno-hospedero de esta bacteria. Lo anterior se sustenta en que mutantes de *Salmonella* que carecen de factores importantes de virulencia, como el antígeno O y el

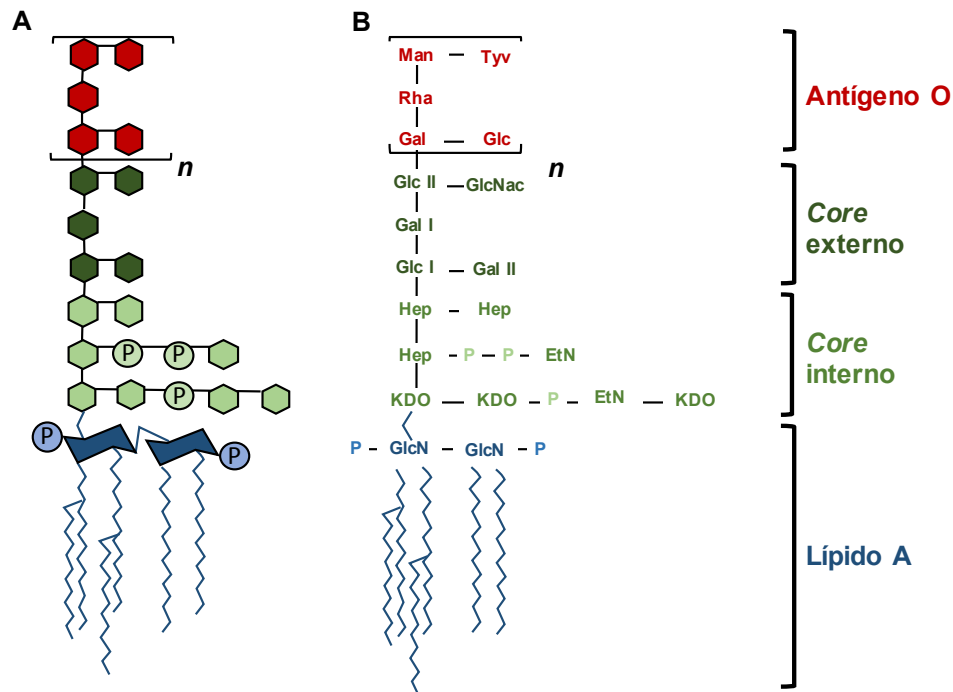
*core* del LPS, son menos virulentas que la cepa silvestre en este hospedero (van der Sar *et al.*, 2003), lo cual se correlaciona con lo observado en hospedero clásicos (Nevola *et al.*, 1985; Ilg *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 1992; Hoare *et al.*, 2006; Bravo *et al.*, 2011).

## **I.2. Estructura y biosíntesis del lipopolisacárido de *Salmonella***

El LPS es un glicolípido complejo, constituido por tres dominios estructurales que son el lípido A, el *core* u oligosacárido central y el antígeno O (AgO) (**Figura 1**). El lípido A corresponde a un dímero de N-acetilglucosamina que se encuentra fosforilado y acilado con un número variable de cadenas de ácidos grasos e hidroxigrasos. El lípido A representa el ancla hidrofóbica del LPS a la membrana externa de la bacteria y es el responsable de la actividad tóxica de la molécula, por lo que se conoce como endotoxina (Rietschel *et al.*, 1994). Este componente está unido covalentemente al *core*, que corresponde a un oligosacárido fosforilado constituido de heptosas (*core* interno) y hexosas (*core* externo) que, a su vez, se une al AgO. Este último está compuesto por un número variable de unidades repetidas de un oligosacárido (conformado por tres a seis unidades de azúcares) y se proyecta hacia el exterior de la superficie bacteriana (Reeves *et al.*, 1996). Tanto el lípido A como el *core* del LPS son conservados en todas las especies de enterobacterias, mientras que el AgO presenta variabilidad estructural incluso dentro de una misma especie en términos de los azúcares que lo constituyen y el orden en que éstos se disponen en el oligosacárido (Nikaido & Vaara, 1985; Schnaitman & Klena, 1993; Raetz & Whitfield, 2002; Caroff & Karibian, 2003).

La biosíntesis del LPS es un proceso complejo que comienza con la síntesis del lípido A en la cara citoplasmática de la membrana interna, donde nueve enzimas son las encargadas de sintetizar el lípido A-Kdo (revisado en Raetz *et al.*, 2009). Sobre esta molécula se ensamblan las azúcares del *core* gracias a la acción de glicosiltransferasas

que, en su mayoría, se encuentran codificadas en el operón *waa* (*rfa*) (revisado en Whitfield, 1995). Cada unidad de lípido A-core es translocada a la cara periplasmática de la membrana interna por la flipasa MsbA (revisado en Wang & Quinn, 2010).



**Figura 1. Estructura del lipopolisacárido (LPS) de *S. Enteritidis*.** **A)** Estructura esquemática del LPS de *S. Enteritidis* (basado en Maeshima & Fernandez, 2013). Se muestran los diferentes dominios que componen el LPS: Antígeno O en rojo, oligosacárido central o *core* (externo e interno) en verde, y lípido A en azul. **B)** Descripción de los azúcares y moléculas que componen el LPS. Abreviaturas: Man: manosa, Rha: ramnosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Tyv: tivelosa, GlcNac: N-acetilglucosamina, Hep: heptosa, KDO: ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico, EtN: etanolamina, GlcN: glucosamina, P: grupo fosforilo. "n": denota el número de unidades repetidas del AgO.

En forma paralela a la síntesis de lípido A-core, en la cara citoplasmática de la membrana interna ocurre la síntesis de los monómeros del AgO a cargo de enzimas que se encuentran codificadas en el operón *wba* (*rfb*) (revisado en Whitfield, 1995). Estos monómeros son translocados a la cara periplasmática de la membrana interna por la proteína Wzx y luego son polimerizados por la acción de la polimerasa Wzy, en conjunto con el regulador de largo de cadena Wzz. Cada cadena de AgO es ligada a una unidad de

lípidos A-core por la ligasa WaaL. Finalmente, el transportador LptABCDEF es el encargado de transportar el LPS completo a la cara externa de la membrana externa (Wang & Quinn, 2010). Es importante mencionar que las bacterias Gram negativo presentan largos de cadena preferenciales de su AgO, que son determinados por los reguladores Wzz. Así, en el caso de *S. Enteritidis* se observa una distribución bimodal que comprende un LPS largo (L-AgO), formado por 16 a 35 unidades repetidas de AgO, y un LPS muy largo (VL-AgO), que está formado por más de 100 unidades repetidas de AgO (Bravo *et al.*, 2008), determinados por los reguladores Wzz<sub>SE</sub> y Wzz<sub>fepE</sub>, respectivamente (Batchelor *et al.*, 1992; Bastin *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2008).

Durante el ciclo infeccioso de *Salmonella*, el LPS participa en los procesos de adherencia, colonización intestinal (Nevola *et al.*, 1985; Ilg *et al.*, 2009) y resistencia a CAMP y al sistema del complemento (Pier *et al.*, Molinaro *et al.*, 2015) Además, es necesario para la adherencia e invasión del epitelio intestinal en las primeras etapas del ciclo infeccioso de *S. Typhi* (Horae *et al.*, 2006) y *S. Typhimurium* (Bravo *et al.*, 2011), y en la resistencia a suero en etapas posteriores (Bravo *et al.*, 2008). Considerando que el LPS está en contacto directo con el medio extracelular, sufre diversas modificaciones en respuesta a los estímulos ambientales a los cuales se enfrenta la bacteria al interior del hospedero para cumplir más eficientemente su rol como factor de virulencia (Simpson & Trent, 2019).

### **I.2.1. Modificación del LPS y su impacto sobre la virulencia de *Salmonella***

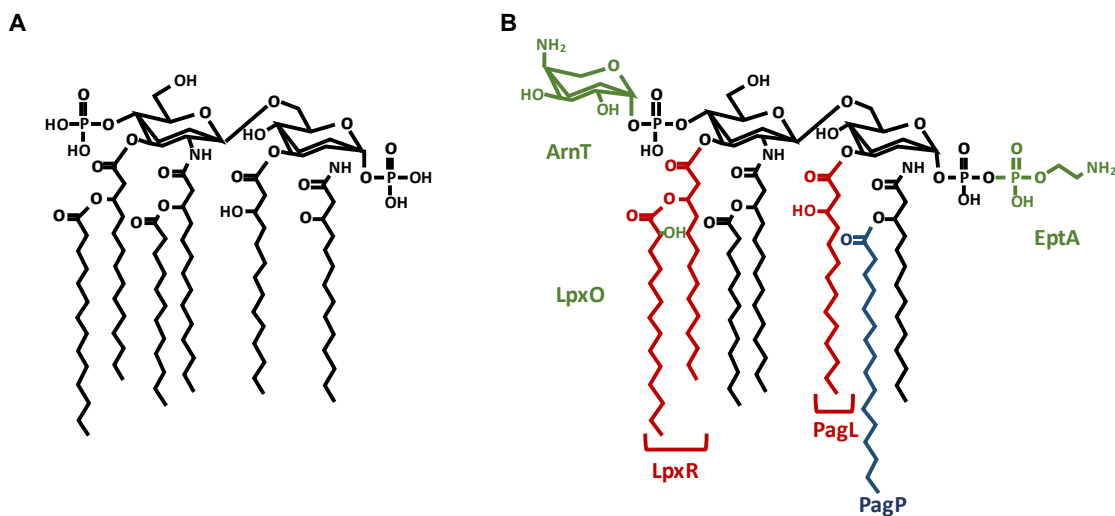
En la actualidad se reconoce al LPS como una estructura dinámica que presenta diversas modificaciones en respuesta a señales ambientales. Si bien todos los dominios del LPS pueden sufrir modificaciones, las realizadas sobre el lípido A son las mayormente estudiadas debido a su impacto sobre la patogénesis de *Salmonella*. El lípido A es el

dominio mínimo del LPS capaz de activar al receptor tipo Toll 4 (TLR4) presente en la superficie de células del sistema inmune innato del hospedero, como los macrófagos (Molinaro *et al.*, 2015). La interacción entre el lípido A y TLR4 desencadena la activación de una vía de señalización en la célula del hospedero que finalmente resulta en la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Takeuchi & Akira, 2010).

La estructura canónica del lípido A corresponde a un dímero de N-acetilglucosamina que se encuentra fosforilado en sus extremos y sustituido con cuatro cadenas de ácidos grasos. A su vez, dos de estas cadenas presentan una cadena de ácidos grasos como sustituyente, lo que genera un lípido A hexaacilado o “canónico” (**Figura 2A**). Existen diversas enzimas de *Salmonella* que son capaces de modificar covalentemente el lípido A con el objetivo de hacer más eficiente el proceso de infección (Raetz & Whitfield, 2002). Dentro de las enzimas modificadoras de lípido A están aquellas que catalizan la adición de grupos polares al lípido A (EptA, ArnT, LpxO), la desacilación de esta molécula (LpxR, PagL) y la adición de cadenas aciladas (PagP) (**Figura 2B**).

EptA es una fosfoetanolamina transferasa que adiciona fosfoetanolamina mayoritariamente al fosfato 1 del lípido A y en ocasiones puntuales al fosfato 4' (Lee *et al.*, 2004). ArnT es una aminoarabinosa transferasa que adiciona aminoarabinosa (L-Ara4N) al fosfato 4' (Gunn *et al.*, 1998; Trent *et al.*, 2001b). Ambos grupos, fosfoetanolamina y L-Ara4N, permiten enmascarar la carga negativa de los fosfatos del lípido A, reduciendo la susceptibilidad de la bacteria a CAMP (Gunn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004). Mutantes de *S. Typhimurium* incapaces de sintetizar y/o transferir L-Ara4N o etanolamina al lípido A son atenuadas en un modelo murino cuando son administradas por vía oral (Gunn *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 2000; Strandberg *et al.* 2012). Por otra parte, LpxO es una dioxigenasa que cataliza la hidroxilación de una cadena acilada del lípido A, dando lugar al motivo

S-2-hidroximiristato. LpxO utiliza  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\alpha$ -cetoglutarato como cofactores y  $\text{O}_2$  como sustrato (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2008). La hidroxilación del lípido A confiere a la bacteria una menor permeabilidad de la membrana frente a iones orgánicos (Murata *et al.*, 2007). Moreira *et al.* (2013) demostraron que mutantes de *S. Typhimurium* que presentan un exceso o deficiencia en la hidroxilación del lípido A son atenuadas en modelos murinos de colitis e infección sistémica.



**Figura 2. Modificación covalente del lípido A de *Salmonella*.** **A)** Lípido A canónico de *Salmonella* (hexaacilado sin modificaciones). **B)** Modificaciones covalentes que puede sufrir el lípido A de *Salmonella*. En verde se muestran los grupos covalentes: aminoarabinosa adicionado por ArnT, fosfoetanolamina por la acción de EptA y el grupo hidroxilo agregado por LpxO. En rojo se muestran las cadenas que son extraídas por las desacilasas LpxR y PagL. La cadena acilada en color azul corresponde al palmitato que agrega la palmitoil transferasa PagP.

LpxR y PagL, corresponden a 3'-O-desacilasa y 3-O-desacilasa de lípido A, respectivamente. Así, LpxR cataliza la producción del lípido A tetraacilado, mientras que PagL produce lípido A pentaacilado (Trent *et al.*, 2001a; Reynolds *et al.*, 2006; Rutten *et al.*, 2009). Por otra parte, PagP es una palmitoil transferasa encargada de generar lípido A heptaacilado (Guo *et al.*, 1998). Está descrito que todas las modificaciones en el número de cadenas del lípido A, catalizadas por LpxR, PagL y/o PagP, son importantes para la

virulencia de *Salmonella* ya que disminuyen la capacidad del LPS de inducir la señalización mediada por TLR4. (Tanamoto & Azumi 2000; Kawasaki *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que la presencia de lípido A penta o heptaacilado conlleva alteraciones en la fluidez de la membrana externa que aumentan la resistencia a CAMP (Guo *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 2007). Incluso, Kawano *et al.* (2010) demostraron que mutantes  $\Delta lpxR$  de *S. Typhimurium* presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos.

Los antecedentes expuestos demuestran que las modificaciones que sufre el lípido A en el transcurso de una infección son importantes para la virulencia de *Salmonella*. Como se mencionó, estas modificaciones no ocurren en forma constitutiva, sino que responden a las condiciones ambientales a las cuales la bacteria se ve expuesta durante su ciclo infeccioso, siendo los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB importantes reguladores de este proceso (Raetz *et al.*, 2007).

### **1.2.2. Reconocimiento del lipopolisacárido de *Salmonella* en *Danio rerio***

El TLR4, receptor altamente conservado en organismos vertebrados, se ha descrito como el principal encargado del reconocimiento del lípido A en modelos clásicos de infección (Miller *et al.*, 2005). Pez cebra posee 2 ortólogos de *tlr4* cuyos productos son capaces de reconocer el lípido A de diversas bacterias, como *E. coli*, y desencadenar una respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B (Jault *et al.*, 2004; Sepulcre *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha reportado que ambos TLR4 de pez cebra eran incapaces de reconocer el lípido A de *S. Typhimurium* (Sepulcre *et al.*, 2009), lo cual resulta novedoso considerando que *Salmonella* y *E. coli* tienen la misma estructura canónica de lípido A (Raetz & Whitfield, 2002). No obstante, *Salmonella* presenta un patrón diferencial de modificaciones del



lípidos A con respecto a *E. coli*, ya que ésta última no presenta ortólogos de *lpxO* y *lpxR* (Raetz *et al.*, 2007). Considerando lo anterior, es concebible pensar que el reconocimiento diferencial del lípido A de *S. Typhimurium* y de *E. coli* por parte de los TLR4 de pez cebra podría ser atribuible a los diferentes patrones de modificación que presenta esta molécula en cada bacteria.

### **1.2.3. Regulación ambiental de la estructura del lípido A de *Salmonella***

Numerosos estudios validan que las modificaciones del lípido A ocurren en respuesta a estímulos ambientales en bacterias Gram negativo (revisado en Raetz *et al.*, 2007). Como se mencionó, el sistema PhoP/PhoQ es un importante regulador de la virulencia en *Salmonella* y responde a las condiciones ambientales que este patógeno enfrenta dentro de la SCV (García Véscovi *et al.*, 1996; Shprung *et al.*, 2012). Este sistema modula la modificación del lípido A mediante el control de la expresión de los genes que codifican las enzimas modificadoras de esta molécula (Guo *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005). La expresión de *pagL* y *pagP* es regulada por este sistema en forma directa (Guo *et al.*, 1998; Trent *et al.*, 2001a). En cambio, PhoP/PhoQ regula en forma indirecta la expresión de *arnT* y *eptA* mediante el control de la activación del sistema PmrA/PmrB (Gunn & Miller, 1996). El sistema PmrA/PmrB es reconocido como un importante regulador de la dinámica estructural del LPS, puesto que además de regular directamente la expresión de *arnT* y *eptA*, modula la distribución de largos de cadena del AgO a través de la regulación de la expresión de los genes que codifican los reguladores de largo de cadena Wzz (Gunn, 2008; Zhou *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2006; Farizano *et al.*, 2012).

Existen otros mecanismos por los cuales se regula la remodelación del lípido A en *Salmonella*. Por ejemplo, Moreira *et al.* (2013) describieron un mecanismo por el cual la proteína VisP es capaz de regular negativamente la actividad de LpxO, mediante la

interacción directa entre ambas proteínas. Por otra parte, el RNA pequeño regulatorio MicF modula la expresión de *lpxR* en forma postranscripcional (Corcoran *et al.*, 2012).

En conjunto, estos antecedentes indican que la modificación del lípido A es un proceso altamente regulado que responde a las condiciones ambientales a las cuales se enfrenta *Salmonella* durante su ciclo infeccioso.

#### **1.2.4. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la estructura del lipopolisacárido**

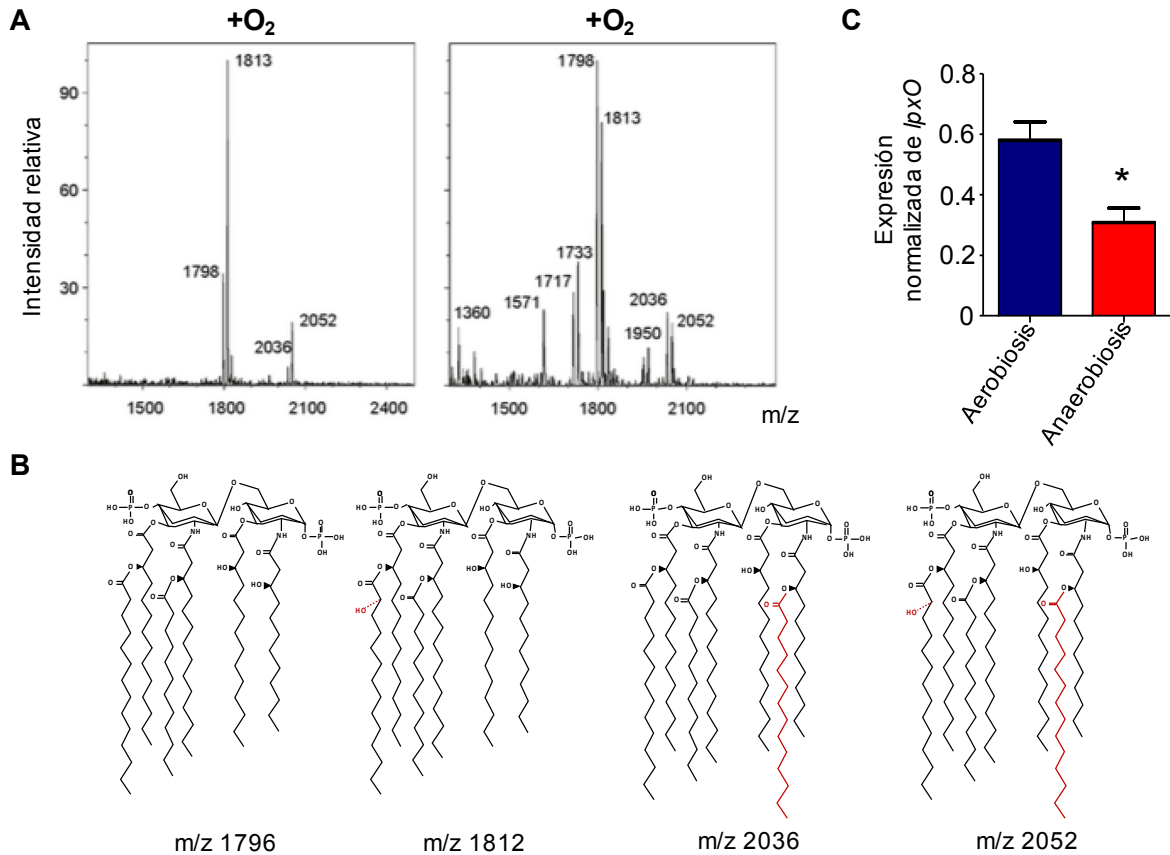
Como se mencionó, el LPS es un factor de virulencia dinámico en *Salmonella* que puede sufrir modificaciones en respuesta a estímulos ambientales, lo que, a su vez, le confiere ventajas adaptativas a este patógeno durante su ciclo infeccioso (revisado en Raetz *et al.*, 2007). Considerando que la baja disponibilidad de oxígeno es una condición a la cual *Salmonella* se enfrenta en el lumen intestinal de su hospedero, es concebible pensar que esta señal ambiental pueda ser utilizada por la bacteria para inducir remodelaciones en la estructura de su LPS.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio muestran que la distribución de largos de cadena del AgO en *S. Enteritidis* es regulada por la disponibilidad de oxígeno. Este fenómeno ocurre debido a que los factores transcripcionales ArcA y Fnr son capaces de controlar en forma antagónica la expresión de los genes *wzz<sub>SE</sub>* y *wzz<sub>lepE</sub>*, que codifican los reguladores de largo de cadena del AgO en esta bacteria (Silva-Valenzuela *et al.*, 2016). Además, trabajos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que la expresión de otros genes involucrados en la síntesis del LPS (*waaQ*, *wzy* y *waaL*) y en su modificación (*arnT*, *eptA*, *eptB*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*) es modulada por la disponibilidad de oxígeno en *S. Enteritidis*. Interesantemente, también se observó que esta regulación dependiente de oxígeno, se pierde en algunos de estos casos en una mutante  $\Delta$ *fnr* de *S. Enteritidis*, lo que

indica que el factor transcripcional Fnr sería responsable de mediar los cambios en la expresión de dichos genes.

Por otra parte, los resultados obtenidos por Felipe Velázquez en su Memoria de Título muestran que el grado de hidroxilación del lípido A depende de la disponibilidad de oxígeno en *S. Enteritidis* (Velásquez, 2016). Esto se evidenció mediante análisis de espectrometría de masas del lípido A y la medición de los niveles de transcrito de *lpxO* (gen que codifica la dioxigenasa responsable de la hidroxilación del lípido A) en *S. Enteritidis* crecida en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Como se observa en la **Figura 3A** (panel izquierdo), en condiciones aeróbicas de crecimiento, la abundancia relativa de especies de lípido A hidroxilado (m/z 1812 y 2052, esquematizados en la **Figura 3B**) fueron mayores que las de sus contrapartes no hidroxiladas (m/z 1796 y 2036, esquematizados en la **Figura 3B**). Sin embargo, en la misma cepa crecida en condiciones anaeróbicas se observó que la abundancia relativa de las especies de lípido A no hidroxiladas era mayor (**Figura 3A**, panel derecho). Además, mediante ensayos de qRT-PCR se determinó que la expresión relativa de *lpxO* disminuye en condiciones anaeróbicas de crecimiento (**Figura 3C**) (Velásquez, 2016). Estos resultados indican que la expresión de *lpxO* es reprimida en condiciones de crecimiento anaeróbico, lo que conlleva la disminución de la hidroxilación del lípido A en *S. Enteritidis* bajo estas condiciones.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sumados a los encontrados en la literatura, nos llevaron a pensar que el oxígeno es un importante modulador de la dinámica estructural del LPS y que tanto Fnr como ArcA podrían participar en este proceso regulatorio.



**Figura 3. La disponibilidad de oxígeno modula la hidroxilación del lípido A y la expresión de *lpxO* en *S. Enteritidis*.** **A)** Se determinó la distribución de especies del lípido A en *S. Enteritidis* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El lípido A fue purificado desde bacterias crecidas en medio mínimo E (MME) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los valores de m/z obtenidos se indican en cada caso. **B)** Esquema de las especies de lípido A identificadas mediante espectrometría de masas. Los valores de m/z teóricos se indican en cada caso. **C)** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión de *lpxO* (normalizada con respecto a la expresión del gen *housekeeping rpoD*) en bacterias crecidas en MME en aerobiosis (barra azul) y anaerobiosis (barra roja). La significancia estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student, \* $p < 0,05$  vs. aerobiosis.

Los antecedentes expuestos se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Durante su ciclo infeccioso *Salmonella* se ve enfrentada a distintas condiciones ambientales, donde uno de los principales desafíos es la baja tensión de oxígeno en el intestino y la sangre del hospedero.

2. La transición desde un ambiente aeróbico a uno anaeróbico contempla cambios en la expresión de un gran número de genes, siendo los factores transcripcionales Fnr y ArcA importantes reguladores de este proceso.
3. Las modificaciones covalentes del lípido A son importantes para la virulencia de *Salmonella*, ya que aumentan la resistencia a CAMP y ayudan a la evasión del reconocimiento por parte de TLR4.
4. Las modificaciones covalentes del lípido A ocurren en respuesta a las condiciones ambientales a las cuales se enfrenta la bacteria. Por lo general, esta regulación ocurre a través del control de la expresión de los genes que codifican las enzimas modificadoras del lípido A.
5. Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y modificación del LPS es modulada por la disponibilidad de oxígeno y que tanto Fnr como ArcA participan en la regulación de este proceso en *S. Enteritidis*.

Cabe mencionar que a la fecha no se han realizado estudios que permitan dilucidar el mecanismo por el cual los factores transcripcionales Fnr y ArcA regulan la expresión dependiente de oxígeno de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en *S. Enteritidis*. Más aún, se desconoce completamente la incidencia que presenta esta regulación sobre la virulencia de esta bacteria.

### **I.3. Hipótesis**

Los factores transcripcionales Fnr y ArcA regulan directamente la expresión de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en respuesta a la disponibilidad de oxígeno en *S. Enteritidis*. Este proceso regulatorio es requerido para la virulencia de *S. Enteritidis*.

### **I.4. Objetivo General**

Determinar el rol de los factores transcripcionales Fnr y ArcA sobre los cambios en la estructura del LPS en respuesta a la disponibilidad de oxígeno y evaluar el efecto de esta respuesta sobre la virulencia de *S. Enteritidis*.

### **I.5. Objetivos Específicos**

1. Determinar si los factores transcripcionales Fnr y ArcA regulan directamente la expresión de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en respuesta a la disponibilidad de oxígeno en *S. Enteritidis*.
2. Determinar el efecto de la regulación transcripcional de los genes involucrados en la dinámica estructural del LPS por parte de Fnr y ArcA sobre la estructura del LPS en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas en *S. Enteritidis*.
3. Determinar el impacto de la regulación de la estructura del LPS mediada por la disponibilidad de oxígeno sobre la infección de *S. Enteritidis* en *Danio rerio*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Reactivos

De Becton Dickinson (East Rutherford, NJ, EEUU) se obtuvo: Difco *Salmonella* O antisuero grupo D1 (Factores 1, 9, 12).

De Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU) se obtuvo: acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), *BioSafe Coomassie G-250*.

De Biotium Inc. (Fremont, CA, EEUU) se obtuvo: GelRed (para tinción de ácidos nucleicos).

De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) se obtuvo: estándares de peso molecular de 100 pb y 1 kb, *Phusion High-Fidelity* DNA polimerasa y T4 DNA ligasa.

De Fermelo S.A. se obtuvo: Oligonucleótidos IDT.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: acrilamida, agarosa ultrapura, lisozima, N,N'-metilenbisacrilamida ultrapura y *Taq* DNA polimerasa.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: acetato de sodio, ácido acético glacial, ácido bórico, ácido cítrico monohidratado, ácido clorhídrico fumante, amoníaco 25%, amortiguador TAE 25x, bacto-agar, carbonato de sodio, cloroformo, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado, cloruro de potasio, cloruro de sodio, etanol absoluto, extracto de levadura, formaldehído, fosfato de amonio y sodio tetrahidratado, fosfato diácido de sodio monohidratado, fosfato monoácido de potasio trihidratado, fosfato monoácido de sodio dihidratado, filtros Millipore (poros de 0,02  $\mu\text{m}$  de diámetro), glicerol, glicina, glucosa, hidróxido de sodio, imidazol, indicador de anaerobiosis Anaerotest, isopropanol, nitrato de plata, persulfato de amonio, peryodato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, TEMED y triptona.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: dNTPs, DTT, *GoTaq* DNA polimerasa, fosfatasa alcalina de camarón y sistema comercial de clonamiento pGEM-T Easy.

De Qiagen (Hilden, Alemania) se obtuvo: sistema comercial para extracción de DNA plasmidial *QIAprep Spin Miniprep kit*, sistema comercial para purificación de DNA desde gel de agarosa *QIAquick Gel extraction kit* y sistema comercial para purificación de productos de PCR *QIAquick PCR purification kit*.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: arabinosa, ampicilina (Amp), azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, carbamoil fosfato disódico, cloranfenicol (Cam), cóctel inhibidor de proteasas *complete mini EDTA-free*, EDTA, kanamicina (Kan) ONPG, proteinasa K y sistema comercial de extracción de DNA genómico *GenElute Bacterial Genomic DNA kit*.

De US Biological (SWAMPSCOTT, MA, EEUU) se obtuvo: SDS, tris base y tricina.

De Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: 6X DNA *loading dye*, *Coomassie plus protein assay reagent*, enzima de restricción *Bam*HI, estándar de albumina, generador de anaerobiosis Anaerogen, estándar de peso molecular *PageRuler prestained protein ladder* y sistema comercial de expresión pBAD-TOPO TA.

De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvo: agua libre de nucleasas y etanol 95%.



## II.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis se indican en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

<b>Salmonella enterica serovar Enteritidis</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Genotipo/Fenotipo relevante</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
NCTC13349	Cepa silvestre	Stock de Laboratorio
$\Delta arcA::Cam$	NCTC13349 $\Delta arcA::Cam$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta fnr::Cam$	NCTC13349 $\Delta fnr::Cam$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta lpxO$	NCTC13349 $\Delta lpxO::FRT$	Stock de Laboratorio
$\Delta lpxO::Kan$	NCTC13349 $\Delta lpxO::Kan$ , $Kan^R$	Stock de Laboratorio
$\Delta lpxO$	NCTC13349 $\Delta lpxO::FRT$	Stock de Laboratorio
$\Delta pagP::Kan$	NCTC13349 $\Delta pagP::Kan$ , $Kan^R$	Este trabajo
$\Delta pagP$	NCTC13349 $\Delta pagP::FRT$	Este trabajo
pWRK-Cam	NCTC13349 $attG1::pWRK-Cam$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta lpxO/pWRK-Cam$	NCTC13349 $\Delta lpxO::FRT$ $attG1::pWRK-Cam$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta lpxO/pWRK-P_{WT-lpxO}$	NCTC13349 $\Delta lpxO::FRT$ $attG1::pWRK-P_{WT-lpxO}$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$	NCTC13349 $\Delta lpxO::FRT$ $attG1::pWRK-P_X-lpxO$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta pagP/pWRK-Cam$	NCTC13349 $\Delta pagP::FRT$ $attG1::pWRK-Cam$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$	NCTC13349 $\Delta pagP::FRT$ $attG1::pWRK-P_{WT-pagP}$ , $Cam^R$	Este trabajo
$\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$	NCTC13349 $\Delta pagP::FRT$ $attG1::pWRK-P_{XX-pagP}$ , $Cam^R$	Este trabajo
$lpxO-lacZ$	NCTC13349 $\phi(lpxO'-lac^+)$ , $Kan^R$	Este trabajo
$lpxO-lacZ \Delta arcA$	NCTC13349 $\phi(lpxO'-lac^+) \Delta arcA::Cam$ , $Kan^R$ , $Cam^R$	Este trabajo
$lpxO-lacZ \Delta fnr$	NCTC13349 $\phi(lpxO'-lac^+) \Delta fnr::Cam$ , $Kan^R$ , $Cam^R$	Este trabajo
$pagP-lacZ$	NCTC13349 $\phi(pagP'-lac^+)$ , $Kan^R$	Este trabajo
$pagP-lacZ \Delta arcA$	NCTC13349 $\phi(pagP'-lac^+) \Delta arcA::Cam$ , $Kan^R$ , $Cam^R$	Este trabajo
$pagP-lacZ \Delta fnr$	NCTC13349 $\phi(pagP'-lac^+) \Delta fnr::Cam$ , $Kan^R$ , $Cam^R$	Este trabajo

<i>P<sub>WT</sub>-pagP-lacZ</i>	NCTC13349 <i>attG1::pWRK- φ(P<sub>WT</sub>-pagP<sup>-</sup>-lac<sup>+</sup>),</i> Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>P<sub>XX</sub>-pagP-lacZ</i>	NCTC13349 <i>attG1::pWRK- φ(P<sub>XX</sub>-pagP<sup>-</sup>-lac<sup>+</sup>),</i> Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>Cepa</b>	<b>Genotipo/Fenotipo relevante</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZΔM15 endA1 recA1 hsdR(r<sub>K</sub> m<sub>K</sub>)</i> <i>supE44 thi-1 gyrA relA1 Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Stock de Laboratorio
DH5α λ <i>pir</i>	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1</i> <i>Δ(lacZYA-argF)U169 deoR Φ80 lacZΔM15</i> <i>λpir</i>	Donado por el Dr. Juan Carlos Salazar
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80</i> <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen

### II.3. Plasmidios

En la **Tabla 2** se señalan los plasmidios utilizados en el desarrollo de esta tesis.

**Tabla 2.** Plasmidios utilizados en esta tesis.

<b>Plasmidio</b>	<b>Características</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
pCLF4	<i>bla</i> PS1 FRT <i>aph</i> FRT P <sub>T7</sub> PS2 oriR6K, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Santiviago <i>et al.</i> , 2009
pCLF3	<i>bla</i> PS1 FRT <i>cat</i> FRT P <sub>T7</sub> PS2 oriR6K, Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup>	Santiviago <i>et al.</i> , 2009
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gam bet exo</i> oriR pSC101 oriTS, Amp <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>bla cat cl857 λP<sub>R</sub> flp</i> pSC101 oriTS, Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup>	Cherepanov & Wackernagel, 1995
pKG136	<i>aph</i> FRT <i>lacZY<sup>+</sup> ths</i> oriR6K, Kan <sup>R</sup>	Ellermeir <i>et al.</i> , 2002
pGEM-T Easy	Vector de clonamiento, Amp <sup>R</sup>	Promega
pGEM-P <sub>WT</sub> - <i>lpxO</i>	pGEM-T que posee clonado el gen <i>lpxO</i> con su promotor silvestre	Este trabajo
pGEM-P <sub>X</sub> - <i>lpxO</i>	pGEM-T que posee clonado el gen <i>lpxO</i> con su promotor mutado en un ABS	Este trabajo
pGEM-P <sub>WT</sub> - <i>pagP</i>	pGEM-T que posee clonado el gen <i>pagP</i> con su promotor silvestre	Este trabajo

pGEM-P <sub>xx</sub> - <i>pagP</i>	pGEM-T que posee clonado el gen <i>pagP</i> con su promotor mutado en dos ABS	Este trabajo
pWRK-Cam	<i>cat oriVR6K int attP (Gifsy-1) P<sub>lac</sub>, Cam<sup>R</sup></i>	Stock de laboratorio
pWRK-P <sub>WT</sub> - <i>lpxO</i>	pWRK-Cam que posee clonado el gen <i>lpxO</i> con su promotor silvestre	Este trabajo
pWRK-P <sub>x</sub> - <i>lpxO</i>	pWRK-Cam que posee clonado el gen <i>lpxO</i> con su promotor mutado en un ABS	Este trabajo
pWRK-P <sub>WT</sub> - <i>pagP</i>	pWRK-Cam que posee clonado el gen <i>pagP</i> con su promotor silvestre	Este trabajo
pWRK-P <sub>xx</sub> - <i>pagP</i>	pWRK-Cam que posee clonado el gen <i>pagP</i> con su promotor mutado en dos ABS	Este trabajo
pBAD-TOPO	Vector de expresión, <i>araC-P<sub>araBAD</sub>, Amp<sup>R</sup></i>	Invitrogen
parcA	pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>arcA</i> de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 (con su promotor), Amp <sup>R</sup>	Silva-Valenzuela <i>et al.</i> , 2016
pfnr	pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>fnr</i> de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349 (con su promotor), Amp <sup>R</sup>	Silva-Valenzuela <i>et al.</i> , 2016
pBAD-ArcA	pBAD-TOPO que posee clonado el ORF <i>arcA</i> de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pBAD-FnrD154A	pBAD-TOPO que posee clonado el ORF <i>fnrD154A</i> de <i>E. coli</i> K12, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pPK822	pUC188 que posee clonado el ORF <i>fnrD154A</i> de <i>E. coli</i> K12, Amp <sup>R</sup>	Lazazzera <i>et al.</i> , 1993

#### II.4. Partidores

En la **Tabla 3** se indican los partidores usados en esta tesis.

**Tabla 3.** Partidores utilizados en esta tesis.

Nombre	Partidor
WarcA1	ACT TCC TGT TTC GAT TTA GTT GGC AAT TTA GGT AGC AAA <u>CCA</u> <u>TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
Warca2	AAC TTA CCG GCT GTT TTT ACG GTT CGG CGC CTG GGC CGA <u>AGT</u> <u>GCA GGC TGG AGC TGC TTC</u>
Wfnr1	GTT AAA ATT GAC AAA TAT CAA TTA CGG CTT GAG CAG ACC <u>TCA</u> <u>TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
Wfnr2	ACG ATA TGG CAG AAG ATA ACA TCA ATG GTT TAG CTG ACG <u>TGT</u> <u>GCA GGC TGG AGC TGC TTC</u>
WlpxO1	AAG GAC AGT GAC GTT ATG TTC GCA GCA <u>GTG CAG GCT GGA GCT</u> <u>GCT TC</u>
WlpxO2	TAC CGC CGG CCG GCT TCA GAG GAG GCT <u>CAT ATG AAT ATC CTC</u> <u>CTT AG</u>

WpagP1	GAA TTT TTG AAC GGT ATG TAT GTT GCG ATG <u>TGC AGG CTG GAG CTG CTT C</u>
WpagP2	CAA TGC CCT TCT CCG TCA AAA CTG GAA <u>ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</u>
arcA-outF	AAA GAG TAC GTC ATA ACG GC
arcA-outR	CCT GTT TCG ATT TAG TTG GC
fnr-outF	CGC CAT GAA GGC TAT CTT TTA TTA T
fnr-outR	CAG AAG ATA ACA TCA ATG GTT TAG C
lpxO-outF	TTT CAT CTC CAT CAT GCC AA
lpxO-outR	CGG ATG GAT AGA CTC AAG GC
pagP-outF	CCG ACA AAT AAA ACG CCA GT
pagP-outR	TGC ATT TTG TCC AGT CGA AC
lpxOE-1F	AGT TTC ATC TCC ATC ATG CC
lpxOE-1R	GTA ACC TTC GCG AAG ATA AA
lpxOE-2F	AAA GCA TTG TGA TCT GGC AG
lpxOE-2R	CAA CTT AAA AGG GCC ATT TT
lpxOE-3F	TGG CCC TTT TAA GTT GTA GA
lpxOE-3R	TCT AAG AAA ACC TCA TCC CG
pagPE-1F	TTC GCT GGC AGG TAA TAC CT
pagPE-1R	AAC CGT CAC GCG CTC CTT AA
pagPE-2F	TTA TTT GTT GTG CTT TGT TT
pagPE-2R	ACC TGA ATA AAA TCT TAA CA
pagPE-3F	ATT CAG GTT AAT GTT GTT AT
pagPE-3R	AGT TTC ATC TCC ATC ATG CC
wbaBE-F	AGT ACG GGC TGC GCA ACC TG
wbaBE-R	CAC TTT TCT ATT CCA TAA GG
wzyE-F	CTA GCA ACG TCT CCC TTA TG
wzyE-R	TTT TTC CCT CAA TTC TTA CGG
waaLE-F	GGA TAC GAT AAA CCG CAG TC
waaLE-R	TCC ACA ATA GGT TTG GGA TG
wzzSE-F	GCC GAC GCT ATC CTC GCC AG
wzzSE-R	CAT AGA TAC CCT AAC TAA AA
fepEE-F	AGC GTA CCG TTT GAT GGA CA
fepEE-R	CAT GCC GTA TGA CCT GAA AA
eptAE-F	TGT CGC CGA ACG CCG CGA AA
eptAE-R	CAT GTT GAT GCG TCC ATC GA
eptBE-F	CGC TTT TTG CCC TGG ATA GC
eptBE-R	CAT GCA AAC AAA CCC TGG GA
lpxRE-F	TCC TGG GGA GGA TAC GAT GT
lpxRE-R	CAC TTT TTA CCC CTG AAT AT
BamHI-lpxO-X1F	GGA TCC AGT TTC ATC TCC ATC ATG CC
lpxO-X1R	TGC CAA AGA GAA AAG TGT AGT TCG TTG <b>TGA</b> ATA AAT TTA CAT TTC TAC AA
lpxO-X2F	TTG TAG AAA TGT AAA TTT ATT <b>CAC</b> AAC GAA CTA CAC TTT TCT CTT TGG CA
BamHI-lpxO-X2R	GGA TCC AAG GCG GAG CCG CTA TCC GG
lpxO-SecR	GCA TTC ACG CGG TGT GGA AA

BamHI-pagP-X1F	GGA TCC CGC CGC CGC GAC TCA TAA GC
pagP-X1R	AAA CAA TAA AAT ATG AAT AAA TTA ATA CTT ATA GCA CTA CAG
pagP-X2F	TTA ATT TAT TCA TAT TTT ATT GTT TGC TTT GTT TTG TG
pagP-X2R	CTG AAT AAA ATC TTA TGA AAC TAT AAA CAG AGA ATA ATC
pagP-X3F	GTT TCA TAA GAT TTT ATT CAG GTT AAT GTT GTT ATT ATC ACA GTC
BamHI-pagP-X3R	GGA TCC GCG AAA AAG TGA TAA ATA TC
pagP-SecR	ATG TAT GTT GCG ATG ATC AT
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
WRK-V6F	CAT GAG AGC TTA GTA CGT GA
WRK-CamR	AAA TCT CGA CAA CTC AAA AA
WRK-lpxOF	GCA TTC ACG CGG TGT GGA AA
WRK-pagPF	ATG TAT GTT GCG ATG ATC AT
WRK-lepAF	CGT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC C
WRK-lepAR	ACT TCA AGA TCC ATT TCC ATC G
lac_137	GAC CAT TTT CAA TCC GCA
kan_137	TTT CTA GAG CTG TTA AAA GGA CA
arcA_ORF-F	ACC ATG CAG ACC CCG CAC ATT CT
arcA_ORF-R	ATC CTG CAG GTC GCC GCA GA
fnr_ORF-F	TAA GAG GAA TAA TAA ATG ATC CCG GAA A
fnr_ORF-R	AGC GAC GTT GCG GGT ATG AC
pBADF	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC

- Las secuencias subrayadas corresponden a las zonas que hibridan con la región que flanquea los *cassettes* de resistencia a antibióticos en los plasmidios pCLF3 y pCLF4.
- Los nucleótidos en color rojo corresponden a los intercambiados para introducir mutaciones puntuales mediante *overlap extension* PCR.

## II.5. Medios y condiciones de cultivo bacterianos

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C en caldo Luria (LB, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L). Los cultivos en medio sólido se realizaron en el mismo medio conteniendo 15 g/L de bactoagar. Las cepas que contienen plasmidios de replicación termosensible (pKD46, pCP20) fueron incubadas a 30°C. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con Cam (20 µg/mL), Kan (50 µg/mL) y/o Amp (100 µg/mL).

Para la extracción de LPS y medición de la actividad β-galactosidasa, se utilizaron bacterias cultivadas en medio mínimo E (MME; 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g/L ácido cítrico

monohidratado, 10 g/L  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 3,5 g/L  $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ ) suplementado con 0,2% glucosa, bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. El cultivo se inoculó (1:100) desde un preinóculo crecido en caldo LB durante toda la noche.

Los cultivos aeróbicos, se incubaron con agitación, mientras que los cultivos anaeróbicos se incubaron en una jarra de anaerobiosis (BBL GasPak System), utilizando el sistema Anaerogen (Oxoid) para generar anoxia. La generación de anaerobiosis se corroboró utilizando el indicador Anaerotest (Merck).

## **II.6. Identificación serológica de las cepas de *S. Enteritidis* mediante ensayos de aglutinación**

En algunos casos fue necesario corroborar que las cepas en estudio correspondían al serotipo D1 de *Salmonella*, al cual pertenece *S. Enteritidis*. Para esto se resuspendió una colonia de bacterias en 20  $\mu$ L de agua desionizada estéril. A la suspensión se agregaron 20  $\mu$ L de antisuero O de grupo D1 de *Salmonella* (BD & Company) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5-10 min, observando si ocurría aglutinación de las bacterias en suspensión.

## **II.7. Purificación y análisis de ácidos nucleicos**

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo utilizando el sistema comercial *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma-Adrich), según las indicaciones del fabricante.

La extracción de DNA plasmidial se realizó utilizando el sistema comercial *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante, con una modificación para aumentar el rendimiento de la purificación. Esta modificación consistió en agregar etanol 100% al lisado celular obtenido en proporción 1:1 v/v (Pronobis *et al.*, 2016).

La purificación de productos de PCR se llevó a cabo utilizando el sistema comercial *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante.

Para la visualización de muestra de DNA, se realizó electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon con 1% agarosa y 1X Gel-Red en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Para la electroforesis, las muestras de DNA se prepararon adicionando 6X DNA *loading dye* hasta una concentración 1X. La electroforesis se realizó a 100 V constantes, luego de lo cual se visualizó el gel sobre un transiluminador UV. Para la purificación de DNA desde un gel de agarosa, las muestras se separaron mediante electroforesis y se cortó la banda de interés. El DNA contenido en el gel se purificó utilizando el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante.

## **II.8. Transformación por electroporación con plasmidios o productos de PCR**

Para la transformación una cepa bacteriana con DNA foráneo, se prepararon células electrocompetentes a partir de un cultivo crecido en caldo LB con agitación hasta una  $DO_{600}$  de 0,6. Se centrifugaron 5 mL del cultivo a 16.000 x *g* por 1 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 5 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 80  $\mu$ L de agua desionizada estéril y se agregó 5  $\mu$ L de DNA plasmidial o 15  $\mu$ L de producto de PCR. Las muestras se incubaron 2 min en hielo y luego se transfirieron a una cubeta de electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador *E. coli Pulser* (Bio-Rad) utilizando un pulso de 1,8 kV. Se agregó 1 mL de caldo LB a las bacterias electroporadas y éstas se recuperaron durante 1 h con agitación a 37°C o 30°C, según corresponda. Finalmente, se sembró 100  $\mu$ L de la

suspensión de bacterias transformadas en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente y se incubaron toda la noche a la temperatura adecuada.

## II.9. Obtención de mutantes de *S. Enteritidis* NCTC13349

Se construyeron mutantes por delección en los genes *arcA*, *fnr*, *lpxO* y *pagP* mediante el método de mutagénesis por remplazo alélico descrito por Datsenko y Wanner (2000), según se detalla a continuación.

### II.9.1. Obtención de productos de PCR

Se diseñaron partidores de 60 pb cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen que se desea mutar, y los extremos 3' contienen 20 nucleótidos (secuencias subrayadas en la **Tabla 3**) que aparean con los plasmidios pCLF4 y pCLF3, lo que permite amplificar el *cassette* génico que contiene el gen de resistencia a antibiótico flanqueado por secuencias FRT. En el caso de pCLF4 se amplificó el *cassette* de resistencia a Kan para la generación de las mutantes  $\Delta lpxO::Kan$  y  $\Delta pagP::Kan$ , y en el caso de pCLF3 se amplificó el *cassette* de resistencia a Cam para la construcción de las mutantes  $\Delta arcA::Cam$  y  $\Delta fnr::Cam$ . La mezcla de reacción de PCR y el programa utilizado fueron los siguientes:

Mezcla de reacción de PCR		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Amortiguador de PCR 10X	10	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3	1,5 mM
dNTPs 10 mM	2	0,2 mM
Partidor 1 10 µM	2	0,2 µM
Partidor 2 10 µM	2	0,2 µM
DNA molde	1	
<i>Taq</i> DNA polimerasa 5 U/µL	0,8	0,04 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	79,2	

Programa de PCR		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	95	2:00
35	95	0:30
	55	0:30
	72	1:45
1	72	5:00



Para la mutación del gen *lpxO* se amplificó el *cassette* génico utilizando los partidores WlpxO1 y WlpxO2, para *pagP* se utilizaron los partidores WpagP1 y WpagP2, para *arcA* se utilizaron los partidores WarcA1 y WarcA2 y para la mutación *fnr* se utilizaron los partidores Wfnr1 y Wfnr2. Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis de DNA en geles de agarosa y se purificaron desde los mismos.

### II.9.2. Mutagénesis por remplazo alélico

La mutagénesis se realizó sobre la cepa de *S. Enteritidis* NCTC13349, previamente transformada con el plasmidio termosensible pKD46, el cual contiene los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago  $\lambda$  bajo el control del promotor  $P_{ara}$ , inducible por arabinosa. Se hizo un cultivo de la cepa *S. Enteritidis*/pKD46 a partir de una dilución 1:100 de un preinóculo crecido toda la noche en LB/Amp con agitación. El cultivo se creció en caldo LB/Amp a 30°C con agitación hasta  $DO_{600} \sim 0,2$ . Luego, se adicionó L-arabinosa 10 mM para inducir la expresión de la recombinasa y se continuó el cultivo hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,6$ . Se prepararon bacterias electrocompetentes (**sección II.8**), las que se transformaron por electroporación con el 15  $\mu$ L del producto de PCR. Inmediatamente, se recuperaron en 1 mL de LB y se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación. La bacterias transformantes se seleccionaron en agar LB suplementado con Kan o Cam, según corresponda, y se analizaron mediante PCR de colonias para confirmar el remplazo alélico. Para esto se utilizó como DNA molde la suspensión de una colonia mutante en 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas estéril. En cada caso se utilizaron los partidores outF y outR (**Tabla 3**) del gen correspondiente. La reacción de PCR y el programa utilizado se detallan a continuación:

Mezcla de reacción de PCR		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Amortiguador de PCR 5X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs 10 mM	0,5	0,2 mM
Partidor 1 10 µM	0,5	0,2 µM
Partidor 2 10 µM	0,5	0,2 µM
DNA molde	0,5	
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa 5 U/µL	0,2	0,04 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	16,3	

Programa de PCR		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	95	5:00
35	95	0:30
	55	0:30
	72	1:00
1	72	2:00

Las mutantes seleccionadas fueron curadas del plasmidio pKD46 mediante siembras sucesivas en agar de LB a 37°C, suplementado con Kan o Cam. Finalmente, se seleccionaron las colonias resistentes a Kan o Cam y sensibles a Amp.

### II.9.3. Movilización de los alelos mutantes por transducción

Para obtener la mutación en un fondo genético limpio, cada alelo mutante se movilizó mediante transducción generalizada, utilizando el bacteriófago P22 HT 105-1 *int*-201 (Schmieger, 1972), según lo descrito por Maloy (1990).

En primer lugar se generó un lisado de partículas transductantes. Para esto se cultivó la cepa de *S. Enteritidis* que contiene la mutación (cepa donante) durante 12 h. Luego, se permitió la infección de 200 µL del cultivo de la cepa donante con 1 mL de caldo de fago P22 (0,1 mL de fago P22 en 2 mL de MME 50x suplementado con glucosa al 2% y esterilizado con cloroformo). La infección se llevó a cabo durante 8 h con agitación a 37°C. El lisado obtenido se centrifugó a 16.000 x *g* por 1 min a temperatura ambiente y se descartó el sedimento. Se repitió la centrifugación y posteriormente, se esterilizó el lisado (sobrenadante) mediante la adición de 200 µL de cloroformo.

Para la transducción se cultivó *S. Enteritidis* silvestre (cepa receptora) durante 12 h. Se agregó 20 µL del lisado de fago P22 obtenido anteriormente a 200 µL del cultivo de la

cepa receptora. La infección se realizó durante 30 min a 37°C sin agitación. Se recolectaron las bacterias mediante centrifugación a 16.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 200 µL de caldo LB fresco y se incubaron durante 20 min a 37°C con agitación para permitir la expresión fenotípica de la resistencia a antibiótico. Las colonias transductantes se seleccionaron en agar LB suplementado con Kan o Cam, según corresponda. Como controles, también se sembró 200 µL del cultivo de la cepa receptora sin infectar y 10 µL del lisado de fago P22 en agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente. La movilización del alelo mutante se comprobó mediante PCR de colonias según se describe en la **sección II.9.2**. Las colonias seleccionadas se sometieron a sucesivos pasajes en placas para remover por completo el fago P22. La ausencia de fago P22 en las cepas transductantes, se corroboró evaluando su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 (Burlage *et al.*, 1998).

Las mutantes de *S. Enteritidis*  $\Delta arcA::Cam$  y  $\Delta fnr::Cam$ , sólo se realizaron hasta este punto, ya que se utilizaron para un segundo evento de movilización por transducción. Por su parte, en la generación de las mutantes  $\Delta lpxO::Kan$  y  $\Delta pagP::Kan$  de *S. Enteritidis*, se decidió escindir el gen de resistencia para evitar posibles efectos polares, como se detalla a continuación.

#### **II.9.4. Eliminación del *cassette* de resistencia**

Las transductantes obtenidas se transformaron mediante electroporación con el plasmidio pCP20 que contiene el gen que codifica la recombinasa FLP, la cual permite la recombinación entre los sitios FRT. Considerando que el plasmidio pCP20 tiene un origen de replicación sensible a temperatura, la recuperación de las bacterias transformantes y su posterior selección en agar LB/Amp se realizó a 30°C. Se corroboró la eliminación del gen

de resistencia a antibiótico por sensibilidad a Kan y mediante PCR de colonias, según se describe en la **sección II.9.2**, con los mismos partidores mencionados en dicha sección. Finalmente, se realizaron siembras sucesivas de las colonias seleccionadas en placas de agar LB a 37°C para curar el plasmidio pCP20.

#### **II.10. Análisis *in silico* de las regiones promotoras**

Las secuencias de las regiones promotoras de los genes de interés se obtuvieron desde EMBL (número de acceso AM933172). Estas secuencias se analizaron utilizando el *software* Virtual Footprinting de Prodoric (<http://www.prodoric.de/vfp/>), para determinar si tenían sitios de unión a ArcA (ABS) o Fnr (FBS) hipotéticos. Además, para determinar el inicio de transcripción hipotético y las posibles posiciones de las cajas -10 y -35, las regiones promotoras se analizaron con el *software* BProm de SoftBerry.

#### **II.11. Reinserción de alelos en el cromosoma de *S. Enteritidis* con plasmidios derivados de pWRK-Cam**

Para estudiar el efecto de la regulación de la expresión de *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno sobre la virulencia de *S. Enteritidis*, se utilizó la estrategia esquematizada en la **Figura 4**. En primer lugar se construyeron plasmidios derivados de pWRK-Cam que contenían una copia del gen con su promotor intacto ( $P_{WT-lpxO}$  y  $P_{WT-pagP}$ ), o con el promotor mutado en sus ABS ( $P_X-lpxO$  y  $P_{XX-pagP}$ , ver análisis detallado de estas regiones en la **sección III.1**). Los plasmidios generados tienen la capacidad de integrarse en el genoma ya que contienen el gen que codifica la integrasa Gifsy-1. De esta manera, la transformación de cepas de *S. Enteritidis* con estos plasmidios permitió la inserción del alelo deseado en el cromosoma de la bacteria. Sin embargo, para asegurar que la

expresión de *lpxO* o *pagP* sólo ocurriera a partir de los alelos contenidos en los plasmidios derivados de pWRK, esta construcción se realizó sobre cepas que carecen del alelo silvestre de dichos genes (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *lpxO* y *S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP*).

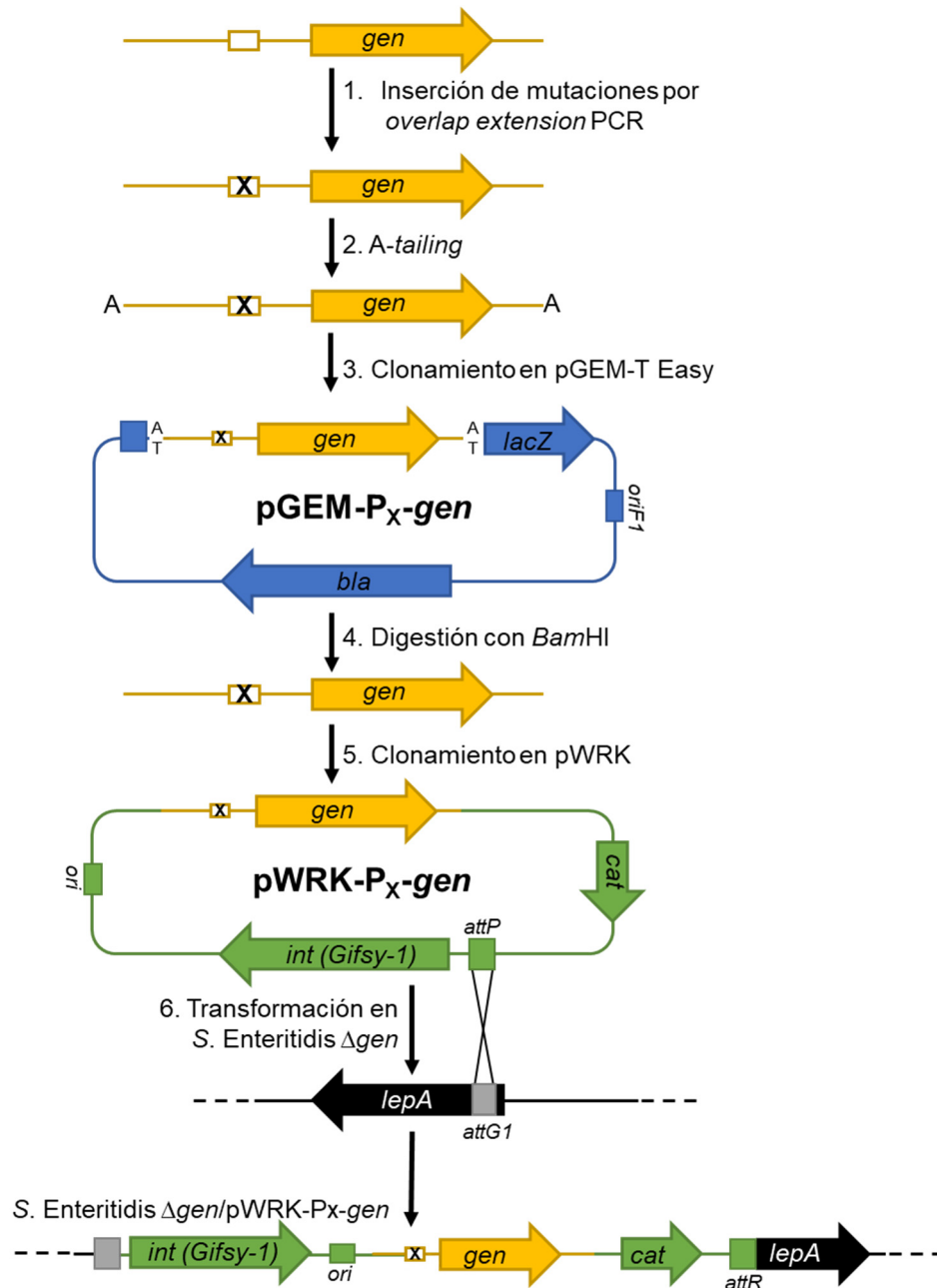
### II.11.1. Inserción de mutaciones puntuales por *overlap extension* PCR

Se amplificaron por PCR diferentes regiones del promotor y el marco de lectura de los genes *lpxO* (2 regiones) y *pagP* (3 regiones) desde el DNA genómico de *S. Enteritidis* (**Figuras 5A y 5B**, paso 1a). Los partidores internos utilizados para esta amplificación, contenían las mutaciones que se desean realizar (nucleótidos en rojo en la **Tabla 3**) y además, eran complementarios unos con otros. Por otra parte, los partidores externos utilizados en esta amplificación contenían sitios de corte para la enzima *Bam*HI en sus extremos 5' (**Figura 5A y 5B**, paso 1). Es importante mencionar que también se amplificaron los genes con sus promotores intactos, utilizando sólo los partidores externos de cada gen. Las reacciones de PCR y el programa utilizados se detallan a continuación:

Mezcla de reacción de PCR		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Amortiguador HF de PCR 5X	10	1X
dNTPs 10 mM	1	0,2 mM
Partidor 1 10 µM	2,5	0,5 µM
Partidor 2 10 µM	2,5	0,5 µM
DNA molde	1,5	
<i>Phusion</i> DNA polimerasa 2 U/µL	0,5	0,04 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	32	

Programa de PCR		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	98	5:00
35	95	0:30
	55	0:30
	72	1:00
1	72	10:00

Los productos obtenidos se purificaron desde geles de agarosa, y se determinó la concentración de DNA en las muestras midiendo su absorbancia a 260 nm.



**Figura 4. Esquema general de la estrategia de inserción de alelos en el cromosoma de *S. Enteritidis* con plasmidios derivados de pWRK-Cam.** En primer lugar se insertaron las mutaciones en los promotores mediante *overlap extension* PCR (Paso 1, explicado más detalladamente en la **Figura 5**). Los amplicones obtenidos, se sometieron a un proceso de *A-tailing* donde se agregaron adenosinas en sus extremos (Paso 2). Lo anterior permitió el clonamiento de este fragmento en el vector pGEM-T Easy (Paso 3). El vector resultante fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI (Paso 4) y el fragmento escindido fue subclonado en el plasmidio pWRK-Cam (Paso 5). La construcción obtenida fue utilizada para transformar *S. Enteritidis* que carece del gen silvestre en su genoma (Paso 6). El plasmidio pWRK-Cam contiene el gen que codifica la integrasa *Gifsy-1*, cuya expresión permite la inserción del plasmidio en el genoma de la bacteria mediante recombinación sitio-específica en el sitio *attG1* presente en el gen *lepA*. De esta manera se generó la cepa mutante de *S. Enteritidis* complementada en *cis* con el gen y su promotor mutado en los sitios de unión a ArCA.

Los productos se ensamblaron mediante *overlap extension* PCR gracias a que presentan complementariedad entre ellos (**Figura 5A** y **5B**, paso 2) utilizando el programa de PCR descrito en esta misma sección y la siguiente reacción:

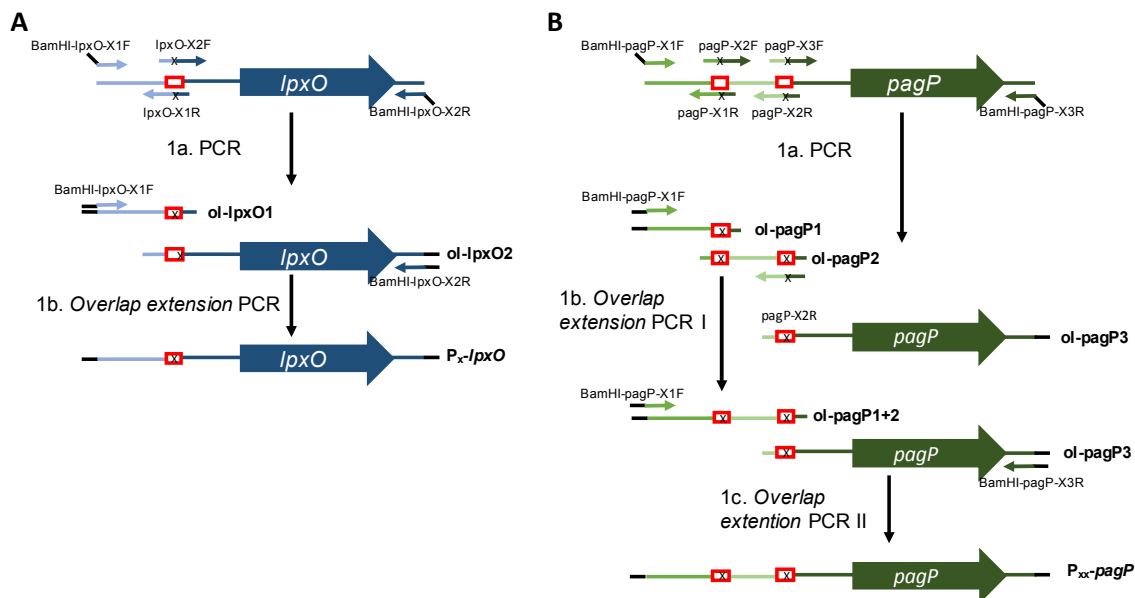
<b>Mezcla de reacción de PCR</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Concentración</b>
Amortiguador de PCR HF 5X	10	1X
dNTPs 10 mM	1	0,2 mM
Partidor 1 10 µM	2,5	0,5 µM
Partidor 2 10 µM	2,5	0,5 µM
Fragmentos de DNA		8 fmol/µL
<i>Phusion</i> DNA polimerasa 5 U/µL	0,5	0,05 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 50 µL	

En el caso del promotor de *pagP*, que contiene dos ABS funcionales, se realizó una segunda reacción de *overlap extension* PCR, bajo las mismas condiciones (**Figura 5B**, paso 1C). Los fragmentos finales se purificaron desde geles de agarosa y se determinó la concentración de DNA en las muestras obteniendo su absorbancia a 260 nm.

### II.11.2. Clonamiento en el vector pGEM-T Easy

Para clonar los productos obtenidos por *overlap extension* PCR en el vector comercial pGEM-T Easy, fue necesario agregar adenosina en los extremos 3' de los fragmentos obtenidos, ya que la DNA polimerasa de alta fidelidad no tiene esta actividad (**Figura 4**, paso 2). La reacción de *A-tailing* utilizada se detalla a continuación:

<b>Mezcla reacción de A-tailing</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Concentración</b>
Amortiguador de PCR 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,5	1,5 mM
dATP 10 mM	1	0,2 mM
Fragmentos de DNA		60 ng/µL
<i>Taq</i> DNA polimerasa 5 U/µL	0,2	0,02 U/µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	hasta 50 µL	



**Figura 5. Esquema de introducción de mutaciones puntuales mediante *overlap extension* PCR.** En la figura se muestra la estrategia y los partidores utilizados para la introducción de mutaciones en el/los ABS del promotor de los genes *lpxO* (A) y *pagP* (B). Se amplificaron regiones del promotor con partidores que tienen las mutaciones que se desean realizar (indicado como “X”, Paso 1a). Seguidamente, dos de los fragmentos obtenidos fueron sometidos a *overlap extension* PCR para realizar su ensamblaje, gracias a las regiones de complementariedad que existen entre ellos (Paso 1b). En el caso del gen *pagP* (B), fue necesario hacer un segundo procedimiento de *overlap extension* PCR para ensamblar los tres segmentos de su promotor (Paso 1c).

La mezcla se dejó incubar 30 min a 72°C, y la integridad del DNA fue corroborada por electroforesis en geles de agarosa. Los productos obtenidos se purificaron utilizando el sistema comercial *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN) y se ligaron en el vector pGEM-T Easy (Figura 4, paso 3) de acuerdo a la siguiente reacción:

Reacción de ligación en pGEM-T		
Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Amortiguador de ligación 2X	5	1X
Vector 50 ng/µL	1	5 ng/µL
Fragmentos de DNA	3	
T4 DNA ligasa 3 U/µL	1	0,3 U/µL

La reacción de ligación se incubó toda la noche a 4°C y con ésta se transformó la cepa *E. coli* DH5α mediante electroporación, seleccionando las transformantes en agar LB suplementado con Amp. Se corroboró la inserción del fragmento mediante PCR de colonias



(sección II.9.2) utilizando los partidores SP6 y T7 que hibridan en regiones adyacentes al sitio de múltiple clonamiento de pGEM-T Easy.

### II.11.3. Subclonamiento en vector pWRK-Cam

Para realizar el subclonamiento de los productos obtenidos por *overlap extension* PCR se digirieron los plasmidios pGEM-P<sub>WT</sub>-*lpxO*, pGEM-P<sub>X</sub>-*lpxO*, pGEM-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pGEM-P<sub>XX</sub>-*pagP* con la enzima *Bam*HI (Figura 4, paso 4) según la siguiente reacción:

Reacción de digestión con <i>Bam</i> HI		
Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Amortiguador <i>Bam</i> HI 10X	2	1X
<i>Bam</i> HI 10 U/μL	2	1 U/μL
Plasmidio	10	
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	6	

La reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C y los productos obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. El fragmento escindido de cada plasmidio, correspondiente a P<sub>WT</sub>-*lpxO*, P<sub>X</sub>-*lpxO*, P<sub>WT</sub>-*pagP* o P<sub>XX</sub>-*pagP*, se purificó desde el mismo gel. Paralelamente, se digirió el plasmidio pWRK-Cam con la misma enzima de restricción en presencia de fosfatasa alcalina de camarón (SAP) para evitar su recircularización. Por lo anterior, se agregó a la reacción de digestión 1 μL de SAP (concentración final: 0,1 U/μL) y 2 μL de amortiguador SAP (concentración final: 1X).

Luego, se ligó el plasmidio pWRK-Cam digerido y los fragmentos P<sub>WT</sub>-*lpxO*, P<sub>X</sub>-*lpxO*, P<sub>WT</sub>-*pagP* o P<sub>XX</sub>-*pagP* (escindidos desde los plasmidios pGEM-T) utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Figura 4, paso 5) y la siguiente reacción:

Reacción de ligación en pWRK-Cam		
Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Amortiguador T4 DNA ligasa 10X	1	1X
T4 DNA ligasa 400.000 U/μL	1	40.000 U/μL
Plasmidio pWRK-Cam	2	
Fragmentos de DNA	6	

Luego de incubar toda la noche a 4°C, se transformó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir por electroporación con los productos obtenidos. Las transformantes se analizaron por PCR de colonias (**sección II.9.2**) utilizando los partidores WRK-V6F y WRK-CamR, y se seleccionaron las colonias que contenían el inserto. La dirección en la que se insertó el gen de interés también fue corroborada por PCR de colonias, utilizando los partidores WRK-V6F y lpxO-3R en el caso de pWRK-P<sub>WT</sub>-lpxO y pWRK-P<sub>X</sub>-lpxO, o WRK-V6F y pagP-3R en el caso de pWRK-P<sub>WT</sub>-pagP o pWRK-P<sub>xx</sub>-pagP.

#### **II.11.4. Transformación e inserción de los plasmidios pWRK en el genoma de *S. Enteritidis***

Se transformó *S. Enteritidis*  $\Delta$ lpxO con los plasmidios pWRK-P<sub>WT</sub>-lpxO y pWRK-P<sub>X</sub>-lpxO, mientras que *S. Enteritidis*  $\Delta$ pagP se transformó con los plasmidios pWRK-P<sub>WT</sub>-pagP y pWRK-P<sub>xx</sub>-pagP (**Figura 4**, paso 6). Las transformantes fueron seleccionadas en agar LB suplementado con Cam y la inserción cromosomal de los plasmidios se corroboró mediante PCR de colonias (**sección II.9.2**) utilizando los partidores WRK-lepAF, que hibrida en el gen *lepA* adyacente al sitio *attG1*, y WRK-lepAR, que hibrida en un región contenida en el plasmidio pWRK.

Para verificar que el plasmidio no se insertó en el *locus* original del gen se realizó un PCR de colonias (**sección II.9.2**) utilizando los partidores lpxO-outF y lpxO-outR, o los partidores pagP-outF y pagP-outR. Se seleccionaron las transformantes en las cuales se obtuvieron 2 amplicones: uno obtenido a partir de la amplificación del gen completo (copia en el *locus attG1*) y otro de menor tamaño obtenido de la amplificación de la cicatriz en el *locus* original del gen.

### **II.11.5. Confirmación de la introducción de las mutaciones puntuales en el promotor de los genes *lpxO* y *pagP***

Para corroborar la introducción de las mutaciones en los ABS del promotor de *lpxO* y *pagP*, se secuenció la región del promotor de estos genes desde los plasmidios derivados de pWRK-Cam (pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO*, pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO*, pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP*) con los partidores lpxOE-1F y lpxO-outR, o pagPE-1F y pagP-outR, según corresponda. Además, se purificó el DNA genómico de las cepas  $\Delta$ *lpxO*/pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO*,  $\Delta$ *lpxO*/pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO*,  $\Delta$ *pagP*/pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* y  $\Delta$ *pagP*/pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* de *S. Enteritidis* y, en cada caso, se amplificó el promotor del gen *lpxO* o del gen *pagP* presente en el plasmidio pWRK. Para amplificar sólo estos promotores (contenidos en el sitio *attG1* dentro del plasmidio pWRK), sin amplificar el promotor silvestre de los genes originales, se utilizaron las parejas de partidores BamHI-lpxO-X1F y lpxO-SecR, y BamHI-pagP-X1F y pagP-SecR. Los segundos partidores de cada pareja hibridan en la región codificante de cada gen, la cual está ausente en el alelo original mutado. Los productos de PCR se purificaron desde geles de agarosa y se determinó la concentración de DNA en las muestras determinando su absorbancia a 260 nm. Se solicitó la secuenciación de estos productos de PCR utilizando los partidores lpxOE-1F y lpxOE-3R, o pagPE-1F y pagPE-3R, según corresponda.

### **II.12. Construcciones de fusiones transcripcionales a *lacZ***

La construcción de fusiones *lacZ* cromosomales se realizó utilizando los plasmidios y procedimientos descritos por Ellermeir *et al.* (2002). Para esto, se transformaron las mutantes *S. Enteritidis*  $\Delta$ *lpxO* y *S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP* con el plasmidio pCP20 y, posteriormente, con el plasmidio pKG136, el cual contiene un sitio FRT río arriba del gen *lacZ*. La expresión de la recombinasa FLP codificada en el plasmidio pCP20 permitió la

inserción del plasmidio pKG136 en el sitio FRT contenido en el *locus* del gen de interés. Las transformantes que incorporaron el plasmidio pKG136 en su genoma se seleccionaron por su resistencia a Kan y posteriormente se corroboró su inserción mediante PCR de colonias (**sección II.9.2**), utilizando los partidores lpxO\_outF o pagP\_outF y lac\_137. Para asegurarse que sólo ocurrió un evento de inserción, también se realizó un PCR de colonias utilizando los partidores lac\_137 y kan\_137, los cuales sólo amplificarán si ocurrió inserción en tándem.

Para el estudio de la expresión de *pagP* en la mutante regulatoria que presenta mutaciones en los ABS (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX}-pagP$ ) y su contraparte con el promotor intacto (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT}-pagP$ ), se recurrió a la misma estrategia pero con pasos adicionales. En primer lugar, se movilizó el alelo *pagP* contenido en el plasmidio pWRK desde las cepas *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT}-pagP$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX}-pagP$  a un fondo genético silvestre mediante transducción generalizada (**sección II.9.3**). Se seleccionaron las transductantes que hayan incorporado el plasmidio pWRK en su genoma en la región adyacente al gen *lepA*. Se realizó mutagénesis mediante remplazo alélico (**sección II.9**) sobre las transductantes y se analizaron las mutantes obtenidas mediante PCR de colonias (**sección II.9.2**) utilizando, en primer lugar, los partidores WRK-V6F y WRK-CamR para seleccionar aquellas colonias que hayan incorporado la mutación en el alelo de *pagP* contenido en pWRK. En segundo lugar, las colonias seleccionadas fueron analizadas por un segundo PCR de colonias utilizando los partidores pagP\_outF y pagP\_outR, para descartar que haya ocurrido simultáneamente un evento de recombinación homóloga en el alelo de *pagP* contenido en su *locus* silvestre. Finalmente, las colonias seleccionadas se transformaron con el plasmidio pCP20 y luego con el plasmidio pKG136 para obtener las fusiones *lacZ* en el promotor intacto y mutado del gen *pagP* ( $P_{WT}-pagP-lacZ$  y  $P_{XX}-pagP-lacZ$ ).

### II.13. Ensayos enzimáticos de $\beta$ -galactosidasa en cultivos de *S. Enteritidis*

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas que contiene las fusiones *lac* se evaluó según Miller (1972). Brevemente, se realizaron cultivos de las cepas en MME bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, hasta alcanzar  $DO_{600} \sim 0,6$ . A 100  $\mu$ L de cada cultivo se agregó 900  $\mu$ L de amortiguador Z ( $Na_2HPO_4$  60 mM,  $NaH_2PO_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4$  1 mM). Se permeabilizó la membrana de las bacterias agregando 10  $\mu$ L de cloroformo y 10  $\mu$ L de SDS 1%, agitando vigorosamente en vortex. A esta suspensión se agregó 200  $\mu$ L de ONPG 4 mg/mL, que corresponde al sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa, y se incubó a 30°C hasta que se observó la aparición de color amarillo en el medio de reacción. La reacción se detuvo agregando 500  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1 M. Las Unidades Miller se determinaron con la siguiente ecuación:

$$Unidades\ Miller = 1000 \times \frac{OD_{420} - 1,75 \times OD_{550}}{volumen\ (mL) \times tiempo\ (min) \times OD_{600}(cultivo)}$$

### II.14. Análisis de la unión de ArcA y FnrD154A a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en *S. Enteritidis*

Se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) con el objetivo de determinar si la regulación oxígeno-dependiente ejercida por ArcA y Fnr ocurría mediante la interacción directa de dichos factores transcripcionales con el promotor de genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS. Además, estos ensayos también se realizaron con el fin de identificar cuál o cuáles de los ABS hipotéticos (determinados para cada promotor mediante herramientas bioinformáticas) eran los principales responsables de esta interacción.

### II.14.1. Amplificación de las regiones promotoras

En primer lugar se amplificaron las sondas de DNA, las cuales corresponden a la región promotora de cada gen en estudio. Esta amplificación se realizó desde el DNA genómico de *S. Enteritidis* según se describe en la **sección II.11.1**, utilizando los partidores E-1F y E-3R de cada gen (**Tabla 3**). También se amplificaron regiones acotadas del promotor de *lpxO* y *pagP*, empleando el promotor completo como DNA molde. Desde el promotor de *lpxO*, se amplificaron tres sondas utilizando las siguientes parejas de partidores: lpxOE-1F y lpxOE-1R (sonda L1); lpxOE-2F y lpxOE-2R (sonda L2); y lpxOE-3F y lpxOE-3R (sonda L3). También se amplificaron 3 sondas desde el promotor del gen *pagP* utilizando las siguientes parejas de partidores: pagPE-1F y pagPE-1R (sonda P1); pagPE-2F y pagPE-2R (sonda P2); y pagPE-3F y pagPE-3R (sonda P3). Los productos de PCR se purificaron desde geles de agarosa y se determinó la concentración de DNA de las muestras mediante su absorbancia a 260 nm.

Para determinar el efecto de las mutaciones puntuales generadas en los promotores de los genes *lpxO* y *pagP*, se amplificaron las mismas sondas de DNA descritas anteriormente a partir de los los plasmidios pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO*, pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO*, pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* (**sección II.11.3**). Para esta amplificación se utilizó la misma reacción de PCR, partidores y programa descritos.

### II.14.2. Obtención de la proteínas recombinantes ArcA y FnrD154A

Para llevar a cabo ensayos de interacción proteína-DNA, fue necesario expresar y purificar los factores transcripcionales ArcA y Fnr. Con este objetivo, se amplificó la región codificante del gen *arcA* desde el DNA genómico de *S. Enteritidis*, utilizando los partidores arcAF y arcAR. Por otra parte, la región codificante del gen *fnrD154A* se amplificó desde el

plasmidio pPK824 utilizando los partidores *fnrF* y *fnrR*. El gen *fnrD154A* codifica una variante de Fnr de *E. coli* K12 que es insensible a oxígeno y, por lo tanto, constitutivamente activa (Lazazzera *et al.*, 1993). Es importante mencionar que *fnrD154A* presenta un 98,4% de identidad con el gen *fnr* de *S. Enteritidis*. La reacción de PCR y el programa son los mismos que se presentan en la **sección II.9.1**.

Los productos de PCR, purificados desde geles de agarosa, se clonaron en el vector pBAD-TOPO, según las indicaciones del fabricante. Las bacterias quimiocompetentes *E. coli* TOP10 se transformaron con los productos de clonamiento, según las indicaciones del fabricante y se seleccionaron las transformantes en agar LB suplementado con Amp. Se corroboró la inserción de las regiones codificantes en el plasmidio y su orientación por PCR de colonias (**sección II.9.2**) utilizando los partidores pBADF, que hibrida con una región del vector, y *arcAR* o *fnrR*, que hibridan con la región codificante de los genes *arcA* y *fnr*, respectivamente. Se seleccionaron aquellas transformantes que hayan incorporado el gen en la misma dirección que el promotor  $P_{araBAD}$  presente en el vector, con el objetivo de inducir la expresión del gen clonado y obtener la proteína fusionada a un segmento de polihistidina en su extremo C-terminal.

*ArcA* y *FnrD154A* fueron purificadas desde las transformantes seleccionadas (*E. coli* TOP10/pBAD-*ArcA* y *E. coli* TOP10/pBAD-*FnrD154A*, respectivamente). Para esto, se realizó 1 L de cultivo de las bacterias en medio LB/Amp a partir de una dilución 1:100 de un inóculo crecido toda la noche. El cultivo se creció con agitación a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,5$ . Luego, se agregó arabinosa al 0,2% y al 0,02% para inducir la expresión de *ArcA* y *FnrD154A*, respectivamente, durante 4 h con agitación a 37°C.

Se colectaron las bacterias mediante centrifugación a 3.500 x g por 10 min y se suspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, DTT 0,5 mM), suplementado con 1 pastilla de inhibidor de proteasas *complete Mini EDTA free*

(Roche) por 100 mL de amortiguador, en una proporción de 2 mL de amortiguador por gramo de sedimento húmedo. Para realizar la lisis celular, se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1 mM. La suspensión se dejó incubar durante 10 min a 37°C y se sonicó brevemente a 10 W en 5 ciclos de 20 seg cada uno, con intervalos de 1 min de espera en hielo. El lisado obtenido se centrifugó a 2.800 x g por 5 min a 4°C y el precipitado fue descartado. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 21.000 x g por 45 min a 4°C y el precipitado fue descartado.

Posteriormente, al lisado clarificado se agregó imidazol a una concentración final de 30 mM y se cargó a un flujo de 1 mL/min en una columna de níquel HisTrap FF de 1 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada con amortiguador de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM). Se realizó un lavado con 20 mL de amortiguador de unión y la elución de la proteína se realizó utilizando una gradiente lineal desde 30 hasta 500 mM imidazol. Las fracciones que contenían las proteínas se identificaron mediante SDS-PAGE y se dializaron contra amortiguador de diálisis (para ArcA: Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2 mM; para FnrD154A: Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 0,5 μM). La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el método de Bradford usando el reactivo comercial *Coomassie Protein Assay Reagent* (ThermoFisher Scientific), según las indicaciones del fabricante. Las muestras de proteínas se almacenaron a -80°C en glicerol al 20%.

Para los ensayos de unión a DNA, ArcA debió ser fosforilada *in vitro*, para lo cual se utilizó carbamoil fosfato como dador del grupo fosforilo. Para esto, la muestra purificada de ArcA se diluyó en amortiguador de fosforilación (Tris-HCl 100 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 125 mM, DTT 2 mM, glicerol 10%, carbamoil fosfato disódico 50 mM) hasta alcanzar una concentración final de 60 μg proteína/mL. La muestra se incubó durante 30 min a 30°C para permitir su fosforilación.



### **II.14.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las fracciones obtenidas de la purificación fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalantes y reductoras. La composición del gel concentrador fue la siguiente: A/BA (37,5:1) 4%, Tris-HCl 230 mM pH 6,8, SDS 0,2%, PSA 0,1%, y TEMED 6,7 mM. La composición del gel resolutorio fue la siguiente: A/BA (37,5:1) 12%, Tris-HCl 720 mM pH 8,8, SDS 0,2%, PSA 0,1%, y TEMED 6,7 mM.

A las muestras de proteínas se les agregó amortiguador de carga (concentración final: glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 20% y azul de bromofenol 0.04% p/v) y se incubaron 10 min a 100°C. Las muestras y el estándar de peso molecular, *PageRuler prestained protein ladder* (Thermo Scientific), se cargaron en los geles y éstos se sometieron a un campo eléctrico de 60 V, hasta la entrada de las muestras al gel separador, y luego de 120 V, hasta completar la resolución del estándar de peso molecular, empleando el amortiguador de corrida (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%). Para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con el reactivo *BioSafe Coomassie G-250*, según las indicaciones del fabricante.

### **II.14.4. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

El ensayo de unión entre ArcA fosforilado (ArcA-P) y las sondas de DNA obtenidas (**sección II.14.1**) se realizó según describió Mika & Hengge (2015). Para esto se incubaron 120 ng de sonda en amortiguador de unión EMSA (concentración final: Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2 mM, glicerol 10%) con diferentes cantidades de ArcA-P (0-1,2  $\mu$ g) en un volumen final de 20  $\mu$ L. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 25°C.

En el caso de FnrD154A, los EMSA se realizaron incubando 120 ng de la sonda de DNA en amortiguador de unión EMSA (concentración final: glutamato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 50  $\mu$ M, glicerol 10%) con 50  $\mu$ g de BSA, diferentes cantidades de FnrD154A (0-2  $\mu$ g) y 120 ng de DNA competidor que correspondía al sitio de múltiple clonamiento del vector pGEM-T Easy, el cual no presenta FBS hipotéticos. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ L y se incubaron durante 30 min a 37°C.

En ambos casos las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida que contenía A/BA (37,5:1) 6%, TBE (Tris-base 890 mM, ácido bórico 890 mM, EDTA 20 mM) 0,5X, PSA 0,1% y TEMED 0,1%. La electroforesis se realizó en amortiguador TBE 0,5X por 60 o 90 min, según el tamaño de la sonda. Para la detección de las sondas de DNA, los geles se incubaron en una solución de Gel Red 5X durante 20 min.

## **II.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida de LPS**

Para determinar si la regulación de la expresión de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS dependiente de oxígeno repercute en la estructura de esta molécula, se analizaron muestras de LPS mediante electroforesis. El procedimiento utilizado fue descrito por Marolda *et al.* (2006). Para esto, se crecieron las bacterias en MME en condiciones aeróbicas o anaeróbicas hasta una  $DO_{600} \sim 0,6$ . Se centrifugó el volumen de cultivo necesario para obtener dos unidades de  $DO_{600}$  en un volumen final de 100  $\mu$ L a 16.000 x *g* por 1 min y el sedimento se resuspendió en 90  $\mu$ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 4%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%). Se agregó 10  $\mu$ l de proteinasa K a cada muestra y éstas se incubaron a 55°C por 90 min.

Se cargaron 5  $\mu$ L de muestra en un gel de electroforesis. La composición del gel concentrador fue la siguiente: A/BA (49,5:3) 4%, Tris-HCl 700 mM pH 8,45, SDS 0,25%, PSA 0,2%, y TEMED 0,2%. La composición del gel resolutivo fue la siguiente: A/BA (49,5:6) 12%, Tris-HCl 1 M pH 8,45, SDS 0,2%, glicerol 8,8%, PSA 0,2%, y TEMED 0,1%. La electroforesis se realizó durante 50 min a 50 V y 90 min a 150 V, empleando una solución de corrida anódica (Tris-base 0,2 M, pH 8,9) en la parte inferior de la cámara de electroforesis y una solución de corrida catódica (Tris-base 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,25) en la parte superior de la misma.

La visualización de las muestras se realizó por tinción de los geles según fue descrito por Tsai & Frasch (1982), con modificaciones. Primero, se fijó el gel toda la noche en un recipiente de vidrio con 200 mL de solución de fijación (etanol 40%, ácido acético glacial 5%). Luego se incubó por 10 min con 200 mL de solución de oxidación (etanol 40%, ácido acético glacial 5%, peryodato de sodio 0,7%) y se lavó tres veces con 200 mL de agua destilada por 10 min cada vez. Posteriormente, se incubó por 10 min con 150 mL de solución de tinción (NaOH 1,9 mM, amoniaco 0,3 %, AgNO<sub>3</sub> 39 mM). Se lavó el gel como se hizo anteriormente y se reveló por 5 a 20 min en 250 mL de solución de revelado (formaldehído 0,02%, ácido cítrico monohidratado 0,24 mM). La reacción se detuvo lavando el gel con agua destilada.

## **II.16. Ensayos de infección de *Danio rerio* con cepas de *S. Enteritidis* mediante inmersión estática**

Con el objetivo de establecer si la regulación de la expresión de los genes *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno influye sobre la virulencia de *S. Enteritidis*, se llevaron a cabo ensayos de infección por inmersión estática utilizando como modelo de hospedero larvas de pez cebra de 2 dpf.

### **II.16.1. Mantenimiento de las larvas de pez cebra**

Tanto el mantenimiento de las larvas como los ensayos de infección de los peces se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Sistemas del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en colaboración con el Dr. Francisco Chávez. Para los ensayos se utilizaron larvas de pez cebra de la línea silvestre *Tab5* de 2 dpf. Las larvas se mantuvieron a 28°C en medio embrionario E3 (NaCl 5mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM). Desde su fecundación hasta el final de los ensayos de infección, el medio de las larvas fue reemplazado por medio fresco cada 24 h.

### **II.16.2. Infección de larvas de pez cebra mediante inmersión estática**

Para los ensayos de infección, las cepas de *S. Enteritidis* se cultivaron en caldo LB a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> ~ 0,6. Se colectaron las bacterias y se lavaron 2 veces con 3 mL de PBS y una vez con igual volumen de medio E3.

En una placa de 6 pocillos, se depositaron 4 mL de medio E3 y 10 larvas de pez cebra por pocillo. Considerando que no existen experiencias previas de infección de larvas de pez cebra con cepas de *S. Enteritidis*, se decidió utilizar dos dosis infectivas, por lo tanto, a cada pocillo se agregó una suspensión de bacterias ajustadas a ~1x10<sup>9</sup> UFC/mL y ~2,5x10<sup>9</sup> UFC/mL, en un volumen total de 8 mL. El número de bacterias viables se determinó mediante dilución seriada y plaqueo en agar LB. Como control se mantuvieron 10 larvas sin infectar. A las 24 h post infección (hpi) se lavaron las larvas con medio E3 y se determinó el desarrollo de la infección cada 24 h a partir de parámetros fisiológicos observables en los peces, asignando un valor de 4 para larvas sanas, hasta un valor 0 para larvas muertas (**Tabla 4**). Cabe mencionar que para reducir la variabilidad poblacional dentro de los individuos infectados, al momento de la infección todas las larvas tenían un

estado fisiológico óptimo (4). Una vez concluidos los ensayos de infección se anestesiaron los individuos sobrevivientes agregando metanosulfonato de tricaina al 0,02% al medio y luego se procedió a sacrificarlos por congelamiento.

## II.17. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de dos grupos experimentales se utilizó la prueba *t* de Student, mientras que para los análisis que comparaban tres o más grupos se utilizó ANOVA de una vía y el test de Bonferroni. La única excepción fue el análisis de supervivencia de larvas de pez cebra, para lo cual se utilizó la prueba Geham-Breslow-Wilcoxon. En todos los casos, para determinar la significancia de los resultados, se consideró un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Índice del estado fisiológico de larvas de *Danio rerio* durante la infección con cepas de *S. Enteritidis*.

Valor asignado al estado fisiológico	Características observables
4	Larvas vitales con flujo sanguíneo y latido cardíaco normal, reactivas al tacto de su cola.
3	Respuesta disminuida al tacto de su cola luego de tocarla 1 o 2 veces, o que presentan nado errático y de corta trayectoria.
2	Respuesta mínima al tacto de su cola (nadan distancias pequeñas erráticamente luego de tocar su cola 3 o más veces) y presentan flujo sanguíneo disminuido.
1	No responden al tacto de su cola y presentan baja frecuencia cardíaca.
0	Larvas muertas, no presentan latido cardíaco y sus colas están torcidas.

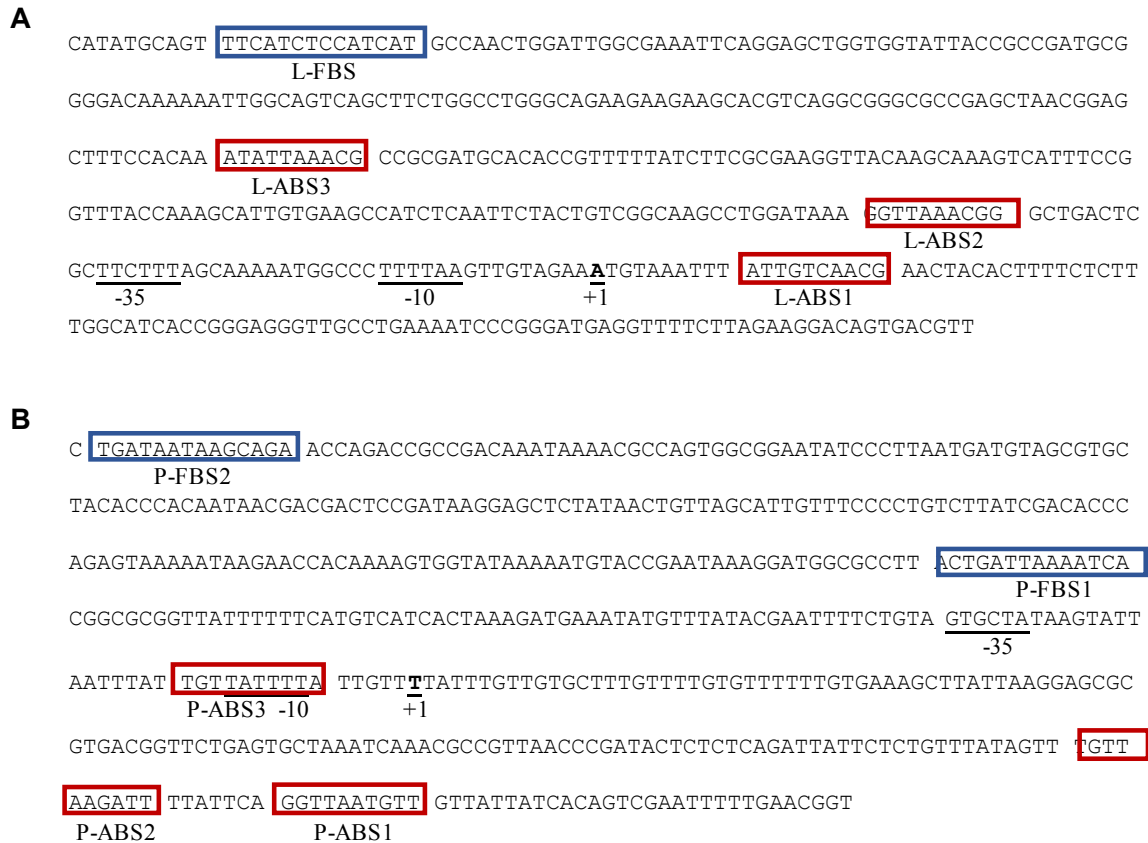
### III. RESULTADOS

#### III.1. La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS presentan sitios de unión funcionales a ArcA y Fnr

##### III.1.1. Análisis bioinformáticos revelan que existen sitios hipotéticos de unión a ArcA y Fnr en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en *S. Enteritidis*

Como se mencionó, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la expresión de algunos genes involucrados en la síntesis (*waaL*, *wbaB*, *wzy*, *wzz<sub>SE</sub>* y *wzz<sub>fepE</sub>*) y modificación (*arnT*, *eptA*, *eptB*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*) del LPS es modulada por la disponibilidad de oxígeno. Para determinar si esta regulación es ejercida por la interacción directa entre el promotor de estos genes con los factores transcripcionales ArcA y/o Fnr, se realizó un análisis bioinformático para buscar probables sitios de unión a ArcA (ABS) y a Fnr (FBS) en estos promotores, utilizando el *software* PRODORIC. Además, se determinó el sitio de inicio de la transcripción hipotético y la posible posición de las cajas -10 y -35 en dichos promotores mediante el *software* BPROM de SoftBerry.

Para estos análisis, se utilizó la secuencia de las regiones promotoras de los genes *lpxO* y *pagP*, considerando 440 y 510 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción, respectivamente. En la región promotora de *lpxO* se encontraron tres posibles ABS centrados en las posiciones -226 (L-ABS3), -50 (L-ABS2) y 15 (L-ABS1), con respecto al probable sitio de inicio de la transcripción. Además, en la misma región se encontró un FBS hipotético centrado en la posición -380 (L-FBS) (**Figura 6A**). En el caso del promotor del gen *pagP*, se encontraron tres posibles ABS centrados en las posiciones -11 (P-ABS3), 128 (P-ABS2) y 145 (P-ABS1), y dos FBS hipotéticos centrados en las posiciones -315 (P-FBS2) y -101 (P-FBS1) (**Figura 6B**).



**Figura 6. La región promotora de los genes *lpxO* y *pagP* contienen ABS y FBS hipotéticos.** Secuencia nucleotídica del promotor de los genes *lpxO* (A) y *pagP* (B). Subrayado se observa el sitio de inicio de la transcripción (+1) y las cajas -10 y -35 predichas, mediante el *software* BProm (SoftBerry). Demarcados en cuadros rojos y azules se muestran los sitios de unión a ArcA y Fnr, respectivamente, predichos por el *software* Virtual Footprinting (Prodoric).

En cuanto a la región promotora de los demás genes analizados, los resultados se resumen en la **Tabla 5** y se muestran en mayor detalle en el **Anexo 1, Figura 19**. Dentro de los promotores de los genes *wbaB*, *wzy*, *wzz<sub>SE</sub>*, *wzz<sub>lepE</sub>*, *eptA*, *eptB*, y *lpxR* se encontraron al menos tres ABS y un FBS hipotéticos, mientras que en el promotor de *waaL* se encontró tres posibles ABS, pero ningún FBS. Por su parte, el promotor de *arnT* no presentó posibles ABS o FBS en su promotor.

**Tabla 5.** ABS y FBS hipotéticos identificados en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS.

Gen	ABS hipotéticos identificados		FBS hipotéticos identificados	
	Cantidad	Posición*	Cantidad	Posición*
<i>wbaB</i>	3	+121, +2, -169	2	+125, -85
<i>wzy</i>	3	-10, -12, -20	2	+98, -109
<i>waalL</i>	3	+188, +46, -98	0	
<i>wzz<sub>SE</sub></i>	3	-117, -221, -312	2	+17, -19
<i>wzz<sub>fepE</sub></i>	3	-14, -92, -109	2	+63, -269
<i>arnT</i>	0		0	
<i>eptA</i>	4	-31, -187, -224, -348	1	-324
<i>eptB</i>	3	+63, +37, -173	1	-35
<i>lpxR</i>	3	-129, -252, -316	3	-80, -177, -377

\*Con respecto al sitio de inicio de la transcripción predicho mediante el *software* BProm de SoftBerry.

### III.1.2. ArcA fosforilado y FnrD154A se unen a las regiones promotoras de genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS *in vitro*

Con el objetivo de determinar si ArcA y Fnr tiene la capacidad de unirse efectivamente a los promotores de los genes en estudio se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA), para lo cual se amplificó la región promotora de dichos genes mediante PCR y luego se incubaron con cantidades crecientes de ArcA fosforilado (ArcA-P) o FnrD154A. Ésta última corresponde a un variante constitutivamente activa de Fnr de *E. coli* K12 (Lazazzera *et al.*, 1993). Como control, los promotores se incubaron con ArcA sin fosforilar y ArcA-P y FnrD154A desnaturalados por calor.

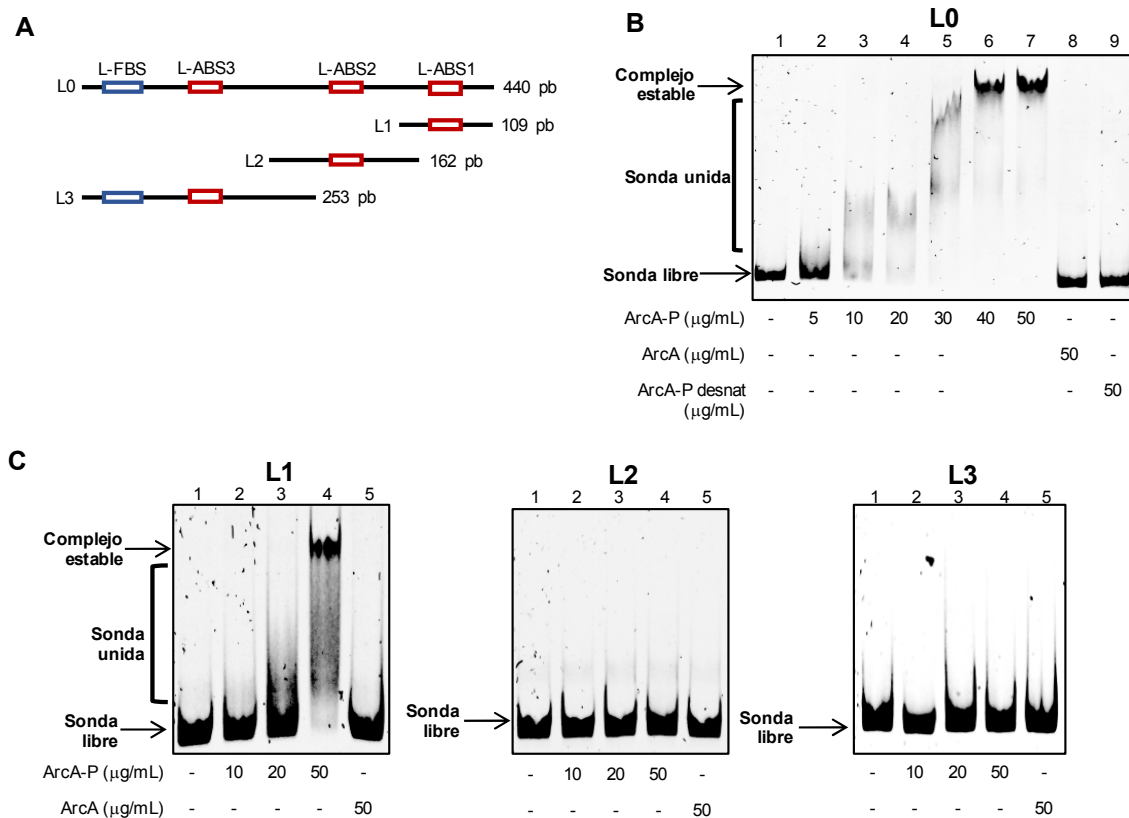
Para estos experimentos, en primer lugar se utilizó una sonda correspondiente al promotor completo de *lpxO*, la que incluye los tres ABS hipotéticos (L0, esquematizado en la **Figura 7A**). Los resultados muestran que ArcA-P retardó la migración de esta sonda de manera dependiente de la dosis (**Figura 7B**, carriles 2-7). A concentraciones iguales o superiores a 40 µg/mL de ArcA-P, se observó una banda discreta de menor movilidad electroforética que refleja la formación de un complejo de mayor estabilidad entre ArcA y la sonda L0 (**Figura 7B**, carriles 6 y 7). Por otra parte, para estudiar la interacción entre ArcA y el promotor del gen *pagP* se utilizó una sonda correspondiente al promotor completo de



este gen, que incluye los tres ABS hipotéticos (P0, esquematizada en la **Figura 8A**). Como se observa en la **Figura 8B** (carriles 3-7), ArcA-P retardó la migración de la sonda P0 también de manera dependiente de la dosis. Se observó la formación de un complejo estable de baja movilidad en presencia de concentraciones iguales o superiores a 30  $\mu\text{g/mL}$  de ArcA-P (**Figura 8B**, carriles 5-7).

Es importante mencionar que tanto ArcA no fosforilado como ArcA-P desnaturado por calor, no retardaron la migración de las sondas L0 y P0 (**Figura 7B y 8B**, carriles 8 y 9). Estos resultados indican que ArcA interactúa *in vitro* con el promotor de los genes *lpxO* y *pagP*, de manera dependiente de su fosforilación y de su estructura nativa, lo cual confirma la presencia de ABS funcionales en estos promotores.

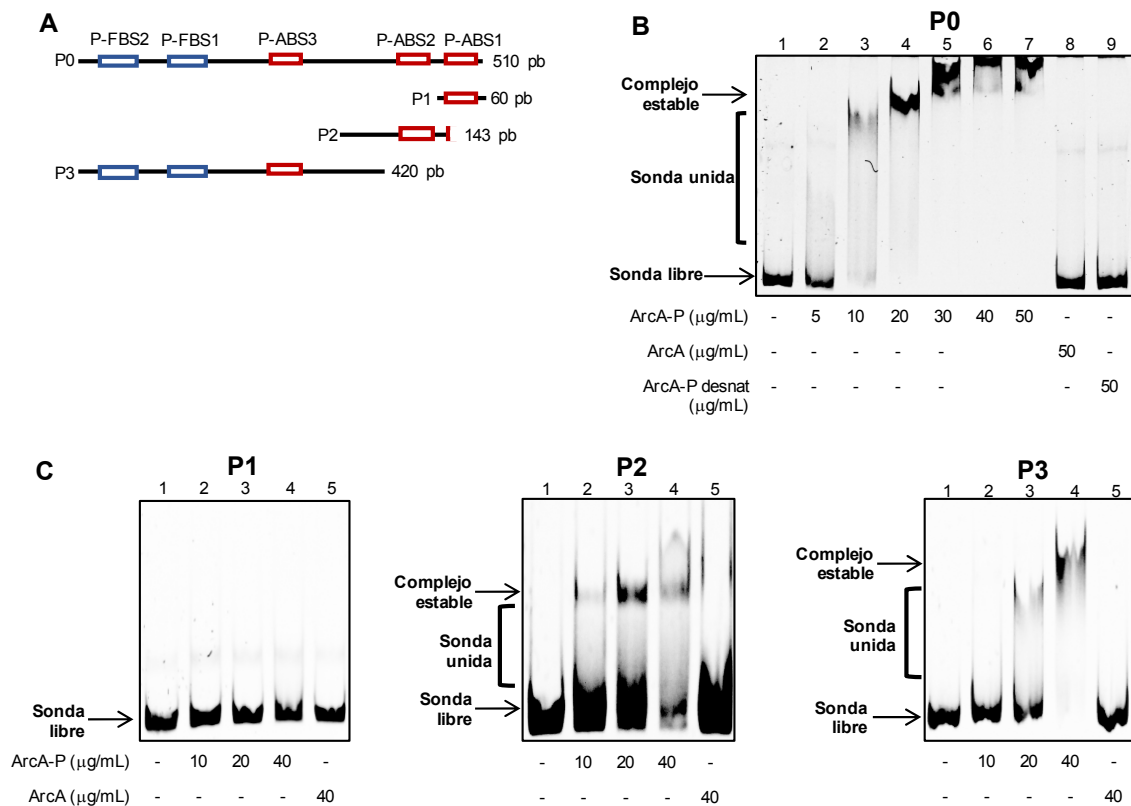
Para determinar cuál o cuáles de los ABS hipotéticos son los responsables de la interacción entre las regiones promotoras de *lpxO* y *pagP* con ArcA-P *in vitro*, se amplificaron sondas de DNA que corresponden regiones acotadas de los promotores de estos genes que sólo contienen un ABS hipotético (L1, L2 y L3, esquematizadas en la **Figura 7A** y P1, P2 y P3, en la **Figura 8A**). Estas sondas se incubaron con cantidades crecientes de ArcA-P para determinar su interacción con la proteína mediante EMSA (**Figuras 7C y 8C**). Con respecto al promotor del gen *lpxO*, ArcA-P retardó la migración de la sonda L1, que incluye L-ABS1, de manera dependiente de la dosis (**Figura 7C**, panel izquierdo, carriles 2-4). Además, se observó que esta interacción es dependiente de la fosforilación de ArcA, ya que la proteína desfosforilada no retardó la migración de la sonda (**Figura 7C**, panel izquierdo, carril 5). Por otra parte, ArcA-P no retardó la migración de las sondas L2 y L3, que incluyen L-ABS2 y L-ABS3 respectivamente (**Figura 7C**, panel central y derecho, carriles 2-4). A partir de estas observaciones, podemos inferir que L-ABS1 (contenido en la sonda L1) es el principal responsable de la interacción del promotor del gen *lpxO* con ArcA-P.



**Figura 7. ArcA-P se une a la región promotora del gen *lpxO* *in vitro*.** **A)** Esquematización de la región promotora de *lpxO* y de las sondas de DNA (L0, L1, L2 y L3) utilizadas en los ensayos de unión a ArcA *in vitro*. Los recuadros rojos representan los ABS putativos y los azules los FBS putativos. **B)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de la sonda L0, que contiene el promotor completo de *lpxO*. La sonda de 440 pb se incubó en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-7). Como control negativo se incubó en ausencia de ArcA (carril 1), en presencia de ArcA sin fosforilar (carril 8) o de ArcA-P desnaturalado por calor (carril 9). **C)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de sondas que corresponden a fragmentos acotados del promotor de *lpxO* que incluyen sólo un ABS putativo (L1, L2 y L3). Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-4). Como control negativo las sondas se incubaron en ausencia de ArcA (carriles 1) y en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 5).

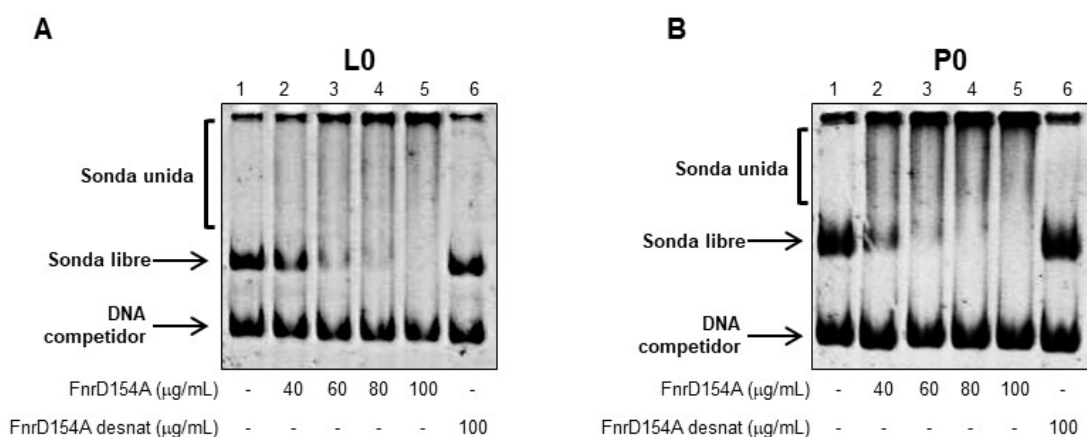
Con respecto al promotor del gen *pagP*, ArcA-P retardó la migración de las sondas P2 y P3, que incluyen P-ABS2 y P-ABS3 respectivamente, de manera dependiente de la dosis (**Figura 8C**, panel central y derecho, carriles 2-4) y de la fosforilación de la proteína (**Figura 8C**, panel central y derecho, carriles 5). Se observó la formación de un complejo estable entre estas sondas y ArcA-P a concentraciones iguales o superiores a 20 µg/mL de proteína, en el caso de P2, y a 40 µg/mL de proteína, en el caso de P3. A diferencia de lo

observado para estas sondas, ArcA-P no retardó la migración de la sonda P1 (que contiene P-ABS1) bajo ninguna condición ensayada (**Figura 8C**, panel izquierdo). De acuerdo a los resultados, podemos inferir que P-ABS2 y P-ABS3 (contenidos en las sondas P2 y P3, respectivamente) son principalmente responsables de la interacción entre el promotor del gen *pagP* y ArcA-P.



**Figura 8. ArcA-P se une a la región promotora del gen *pagP* *in vitro*.** **A)** Esquematización de las región promotora de *pagP* y de las sondas de DNA (P0, P1, P2 y P3) utilizadas en los ensayos de unión a ArcA *in vitro*. Los recuadros rojos representan los ABS putativos y los azules los FBS putativos. **B)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de la sonda P0 que contiene el promotor completo de *pagP*. La sonda de 510 pb se incubó en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-7). Como control negativo se incubó P0 en ausencia de ArcA (carril 1), en presencia de ArcA sin fosforilar (carril 8) o de ArcA-P desnaturalizado por calor (carril 9). **C)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de sondas que corresponden a fragmentos acotados del promotor de *pagP* que incluyen sólo un ABS putativo (P1, P2 y P3). Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-4). Como control negativo las sondas se incubaron en ausencia de ArcA (carriles 1) y en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 5).

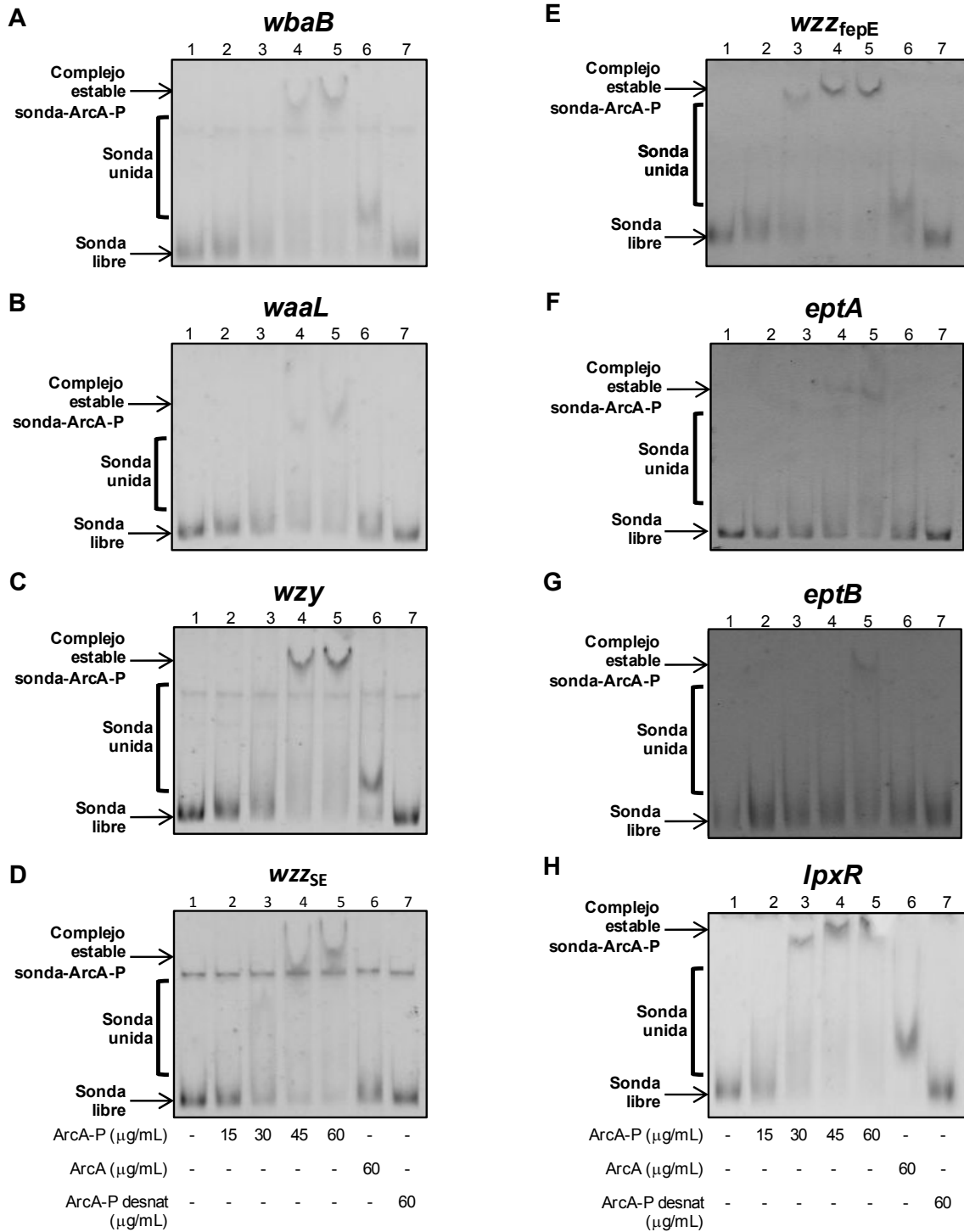
También se realizaron EMSA para determinar si el promotor de estos genes se une directamente *in vitro* a FnrD154A. Los resultados del ensayo muestran que FnrD154A retardó la migración de las sondas L0 y P0 de manera dependiente de la dosis (**Figura 9**, carriles 2-5) y que la proteína desnaturada por calor no alteró la migración de estas sondas (**Figura 9**, carriles 6). Para corroborar que la interacción entre la proteína y las sondas de DNA fuese específica, en la reacción de unión se incluyó un DNA competidor que no presenta FBS hipotéticos. Este DNA competidor no alteró su migración bajo ninguna de las condiciones ensayadas, lo cual demuestra que FnrD154A interactúa en forma directa y específica con las regiones promotoras de *lpxO* y *pagP* *in vitro*, indicando la presencia de FBS funcionales en estos promotores.



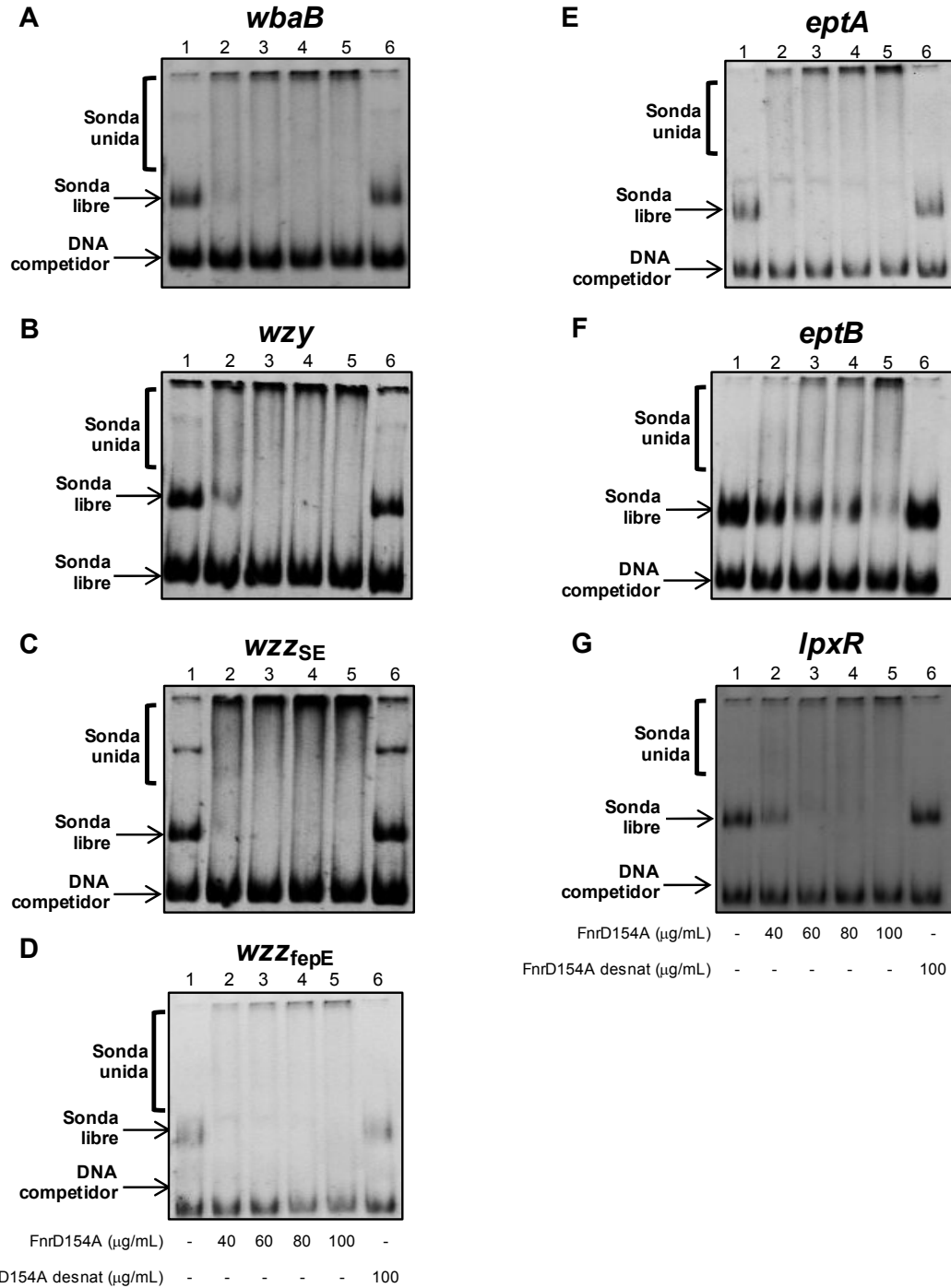
**Figura 9. FnrD154A se une a la región promotora de los genes *lpxO* y *pagP* *in vitro*.** EMSA utilizando las sondas L0 (**A**) y P0 (**B**), que incluyen el promotor completo de *lpxO* y de *pagP*, respectivamente. Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de FnrD154A (carriles 2-5). Como control negativo se incubaron las sondas ausencia de FnrD154A (carriles 1) y en presencia de FnrD154A desnaturada por calor (carriles 6). Bajo todas las condiciones se utilizó un DNA competidor de 256 pb, que corresponde al sitio de múltiple clonamiento del plasmidio pGEM-T Easy.

En cuanto a los demás genes analizados, ArcA-P retardó la migración de sondas de DNA correspondientes a los promotores de *wbaB*, *wzy*, *waaL*, *eptA*, *eptB* y *lpxR* de manera dependiente de la dosis (**Figura 10**, carriles 2-5). Más aún, la unión entre el factor

transcripcional y las sondas resultó dependiente de la fosforilación de la proteína y su estructura nativa, ya que no se observó cambios en la migración de las sondas en presencia de ArcA sin fosforilar o de ArcA-P desnaturalada por calor (**Figura 10**, carriles 6 y 7). Por su parte, FnrD154A también retardó la migración de estas sondas de manera dependiente de la dosis (**Figura 11**, carriles 2-5) y de la estructura nativa de la proteína (**Figura 11**, carril 6). Se decidió no realizar los EMSA con el promotor del gen *arnT* dado que no se encontraron cajas hipotéticas de unión para ninguno de los factores transcripcionales en estudio. Lo mismo se decidió para el promotor de *waaL*, que no posee FBS hipotéticos. En conjunto, estos resultados revelaron que ArcA-P y FnrD154A se unen específicamente a las regiones promotoras de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS, lo que a su vez corroboró la presencia de ABS y/o FBS funcionales en dichos promotores.



**Figura 10. ArcA-P se une a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en *S. Enteritidis*.** EMSA utilizando sondas que contienen el promotor completo de los genes *wbaB* (A), *wzy* (B), *waaL* (C), *wzz<sub>SE</sub>* (D), *wzz<sub>TepE</sub>* (E), *eptA* (F), *eptB* (G) y *lpxR* (H). Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-5). Como control negativo se incubaron los promotores en ausencia de ArcA-P (carriles 1) y en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 6) y ArcA-P desnaturalada por calor (carriles 7).



**Figura 11. FnrD154A se une a la región promotora de genes de *S. Enteritidis* involucrados en la dinámica estructural del LPS.** EMSA utilizando sondas que contienen el promotor completo de los genes *wbaB* (A), *wzy* (B), *WZZ<sub>SE</sub>* (C), *WZZ<sub>fepE</sub>* (D), *eptA* (E), *eptB* (F) y *lpxR* (G). Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de FnrD154A (carriles 2-5). Como control negativo se incubaron los promotores en ausencia de FnrD154A (carriles 1) y en presencia de la proteína desnaturada por calor (carriles 6). En todos los casos se utilizó un DNA competidor de 256 pb, que corresponde al sitio de múltiple clonamiento del plasmidio pGEM-T Easy.

## III.2. Construcción de mutantes regulatorias en *S. Enteritidis*

### III.2.1. Selección de los genes involucrados en la dinámica estructural del LPS sobre los cuales se construyeron las mutantes regulatorias de *S. Enteritidis*

Si bien hasta ahora hemos logrado establecer que la expresión de genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS son regulados por la disponibilidad de oxígeno, la siguiente etapa de esta tesis pretendió estudiar el efecto de esta regulación sobre la virulencia de *S. Enteritidis*. En este contexto, se decidió no continuar estudiando el efecto de esta regulación sobre genes involucrados en la síntesis del LPS (*wbaB*, *wzy*, *waal*, *wzz<sub>SE</sub>* y *wzz<sub>lepE</sub>*), ya que que la disponibilidad de oxígeno afecta el metabolismo de sus precursores (lípidos y azúcares nucleotídicas) (revisado en Cronan, 2003 y Fraenkel & Vinopal, 1973). Como se mencionó, el proceso de síntesis del LPS requiere de la acción de más de 50 proteínas, cuya expresión es regulada a nivel transcripcional (Bittner *et al.*, 2004; Landini & Zehnder, 2002; Skovierova *et al.*, 2005) y postranscripcional (Arends *et al.*, 2016; Klein & Raina, 2015) en respuesta a estrés nutricional (Bittner *et al.*, 2004) o de membrana (Skovierova *et al.*, 2005), factores ambientales que también pueden ser afectados por la disponibilidad de oxígeno. En total, la consideración de todos estos factores ambientales que podrían influir sobre la síntesis del LPS dificultaría la interpretación de los resultados.

Por otra parte, como se mencionó, el perfil de especies de lípido A detectado mediante espectrometría de masas en *S. Enteritidis* crecida en MME, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, muestra 4 especies principales: lípido A canónico (hexaacilado), lípido A heptaacilado y sus contrapartes hidroxiladas (**Figura 3**). Es así que, bajo estas condiciones de crecimiento, sólo se logró observar las especies producidas por las enzimas LpxO y PagP, codificadas en los genes *lpxO* y *pagP*, respectivamente. Debido a lo anterior, se descartaron de este estudio los genes que codifican otras enzimas modificadoras del LPS



(*eptA*, *eptB* y *lpxR*), debido a que no podemos asegurar que se estén expresando bajo las condiciones de estudio.

### III.2.2. La regulación oxígeno dependiente de la expresión de *lpxO* y *pagP* es modulada por ArcA en *S. Enteritidis*

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio revelaron que la expresión de *lpxO* (**Figura 3C**) y *pagP* (resultados no mostrados) es afectada por la disponibilidad de oxígeno; sin embargo, desconocemos si esta regulación dependiente de oxígeno es modulada de manera negativa o positiva por ArcA y/o Fnr. Con el objetivo de esclarecer esta interrogante, se decidió estudiar la actividad de los promotores de *lpxO* y *pagP* mediante la construcción de fusiones transcripcionales a *lacZ* cromosómicas en los fondos genéticos silvestre,  $\Delta fnr$  y  $\Delta arcA$  de *S. Enteritidis*. De esta forma, se determinó la actividad enzimática del gen reportero en las cepas crecidas en MME en aerobiosis y anaerobiosis.

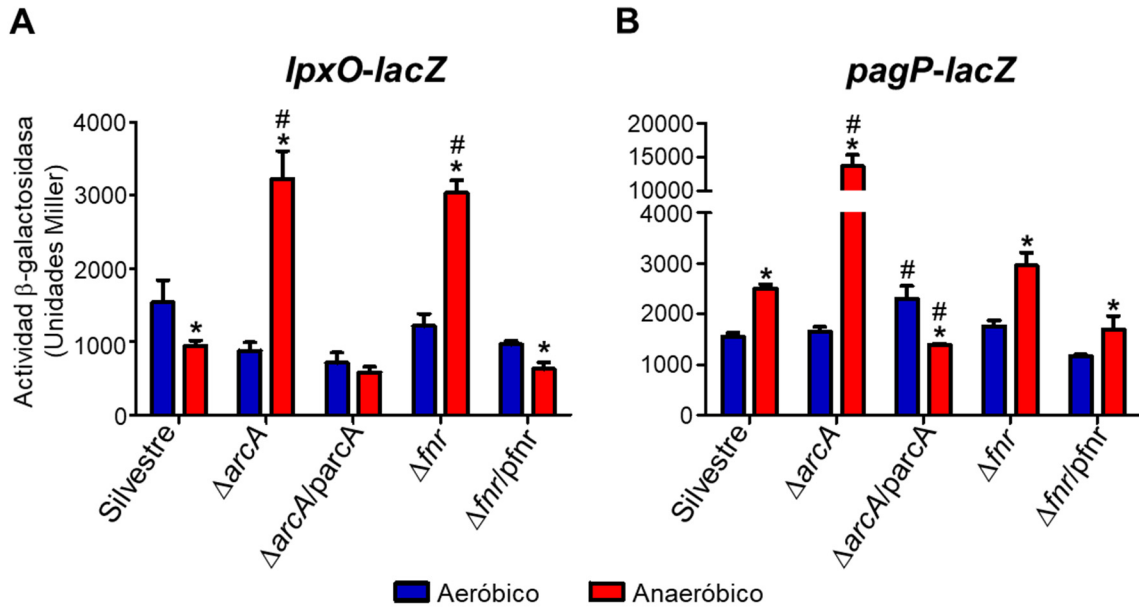
Como se muestra en la **Figura 12A**, la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *lpxO-lacZ* construida en un fondo genético silvestre, disminuyó significativamente cuando la cepa se cultivó bajo condiciones anaeróbicas respecto a la cepa crecida aeróbicamente, lo cual refleja una disminución en la actividad del promotor de *lpxO*. Por otra parte, en condiciones de crecimiento aeróbico, la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *lpxO-lacZ* construida en los fondos genéticos  $\Delta arcA$  y  $\Delta fnr$  de *S. Enteritidis* fue similar a la de la cepa silvestre. No obstante, bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento en las cepas mutantes se observó un incremento de hasta tres veces en la actividad del reportero en comparación a la condición aeróbica, fenómeno contrario a lo observado en la cepa silvestre. Cabe mencionar que la restitución de una copia intacta de los genes correspondientes en las mutantes  $\Delta arcA$  y  $\Delta fnr$  complementó el fenotipo silvestre en ambas condiciones de

crecimiento. De estos resultados se desprende que ArcA y Fnr regulan negativamente la expresión de *lpxO* cuando *S. Enteritidis* es crecida bajo condiciones anaeróbicas.

Por otra parte, la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *pagP-lacZ* construida en los fondos genéticos silvestre,  $\Delta arcA$  y  $\Delta fnr$  de *S. Enteritidis* aumentó significativamente cuando estas bacterias se cultivaron bajo condiciones anaeróbicas en comparación con las mismas cepas crecidas en condiciones aeróbicas (**Figura 12B**). Sin embargo, este aumento (que fue de 1,5 veces en la cepa silvestre y en la mutante  $\Delta fnr$ ) fue notoriamente mayor en la mutante  $\Delta arcA$  (alrededor de 15 veces). Interesantemente, la actividad del reportero disminuyó en la cepa  $\Delta arcA/parcA$  bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento, lo cual indica que el incremento en el número de copias de *arcA* también afecta la actividad del promotor de *pagP*. En conjunto, estos resultados sugieren que ArcA es un represor de la expresión de *pagP* en condiciones anaeróbicas, mientras que Fnr no participa en la regulación de la expresión de este gen bajo estas condiciones.

### **III.2.3. Selección de las mutaciones puntuales a generar en los promotores de *lpxO* y *pagP* en *S. Enteritidis***

Los resultados presentados hasta este punto sugieren que el factor transcripcional ArcA es un represor de la expresión de *lpxO* y *pagP* en condiciones anaeróbicas de crecimiento y que ejercería esta acción mediante su unión directa al promotor de estos genes en *S. Enteritidis*. Lo mismo se sugiere para Fnr en el caso de la expresión del gen *lpxO*. Con el fin de estudiar el impacto de esta regulación oxígeno-dependiente sobre la virulencia de *S. Enteritidis*, se construyeron mutantes regulatorias de dichos genes.



**Figura 12. ArcA participa en la regulación de la expresión de *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno en *S. Enteritidis*.** Se construyeron fusiones transcripcionales *lpxO-lacZ* (A) y *pagP-lacZ* (B) en *S. Enteritidis* en los fondos genéticos silvestre,  $\Delta arcA$ ,  $\Delta arcA/parcA$ ,  $\Delta fnr$  y  $\Delta fnr/pfnr$ . Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas que contenían estas fusiones crecidas en MME bajo condiciones aeróbicas (barras azules) y anaeróbicas (barras rojas). Para la comparación entre ambas condiciones de crecimiento de una misma cepa (aeróbico vs. anaeróbico) se determinó la significancia estadística mediante la prueba *t* de Student,  $*p < 0,05$  vs. la misma cepa crecida en condiciones aeróbicas. Para la comparación entre las diferentes cepas bajo una misma condición de crecimiento se determinó la significancia estadística mediante la prueba ANOVA de una vía,  $\#p < 0,05$  vs. la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones.

Para la construcción de estas mutantes regulatorias, en primer lugar fue necesario determinar qué mutaciones se introducirían en sus promotores. En este contexto, se decidió estudiar el efecto de la regulación ejercida por ArcA sobre la expresión de *lpxO* y *pagP*, considerando que los ABS contienen dos nucleótidos conservados que son absolutamente necesarios para la unión de la proteína al DNA (Evans *et al.*, 2011). En el caso de los FBS, no se han definido nucleótidos críticos para su unión al DNA, por lo que la mutación de estos sitios no podría asegurar cambios en la afinidad entre los FBS y Fnr (Fink *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2013).

Según los resultados obtenidos por EMSA, la caja L-ABS1 del promotor del gen *lpxO* sería la principal responsable de su interacción con ArcA-P (**Figura 7C**), mientras que las cajas P-ABS2 y P-ABS3 serían las mayormente responsables de la interacción entre el promotor de *pagP* y ArcA-P (**Figura 8**). Debido a lo anterior, los ABS mencionados fueron seleccionados para ser mutados y así estudiar el efecto de esta regulación dependiente de oxígeno sobre la virulencia de *S. Enteritidis*.

A grandes rasgos, la construcción de estas mutantes regulatorias (esquematizada en la **Figura 4**) se realizó sobre mutantes que carecían de los genes cuya regulación se quería estudiar (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$ ), a las cuales se les reinsertó cromosomalmente una copia única del gen correspondiente en un *locus* diferente al original. Estos alelos reinsertados presentaban mutaciones en los posibles sitios de unión a ArcA (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX}-pagP$ ). Como control para este estudio, también se construyeron cepas a las cuales se les reinsertó una copia intacta del gen (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT}-pagP$ ). La construcción de las mutantes regulatorias (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX}-pagP$ ) y sus contrapartes intactas (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT}-pagP$ ) se detallan en el **Anexo 2**.

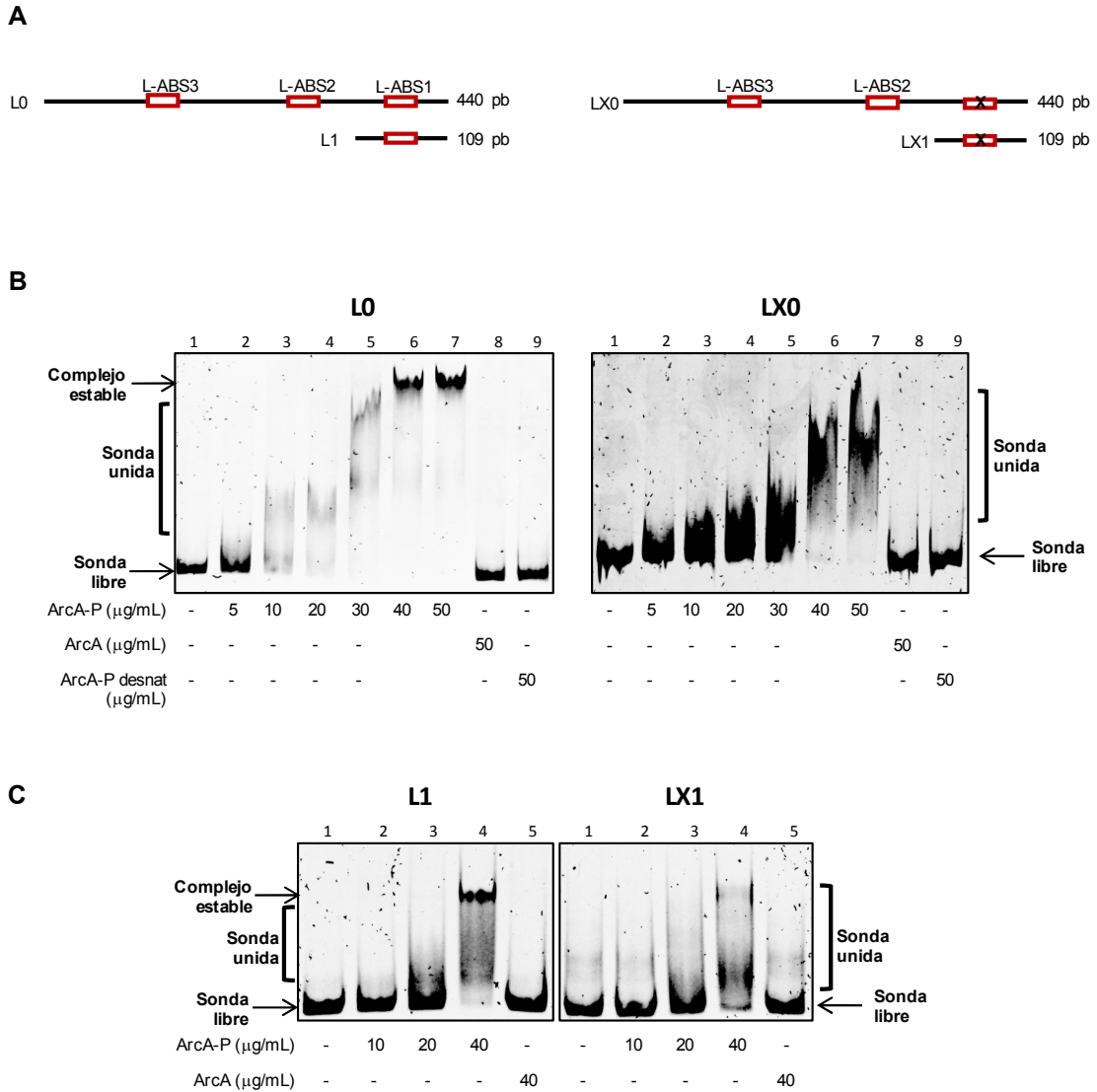
### **III.3. La mutación puntual de los ABS presentes en la región promotora de los genes *lpxO* y *pagP* disminuye la afinidad de los promotores por ArcA-P**

Para determinar si las mutaciones introducidas en los promotores de los genes *lpxO* y *pagP* tienen un efecto funcional sobre la unión a ArcA-P, se realizaron EMSA utilizando sondas que corresponden a las regiones promotoras de *lpxO* mutadas en L-ABS1 (LX0 y LX1, esquematizadas en las **Figura 13A**) o sondas que contienen el promotor de *pagP* con

P-ABS2 y/o P-ABS3 mutados (PX0, PX2 y PX3, esquematizadas en las **Figura 14A**). Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos, éstos se comparan con los EMSA descritos en la **sección III.1.2**, los cuales se realizaron con las sondas que no presentaban mutaciones en los ABS.

Los resultados muestran que si bien ArcA-P retarda la migración de la sonda LX0, que incluye la mutación en L-ABS1, no se detectó la formación de un complejo estable a todas las concentraciones de proteína ensayadas (**Figura 13B**, panel derecho, carriles 2-6). Además, cuando LX0 se coincubó con hasta 30  $\mu\text{g/mL}$  de ArcA-P se observó que gran parte de la sonda se mantuvo libre (carriles 2-5). Por su parte, como se describió anteriormente, ArcA-P retardó la migración de la sonda L0 que contiene L-ABS1 intacto (**Figura 13B**, panel izquierdo). No obstante, a diferencia de lo evidenciado para LX0, el retardo en la migración de L0 se observó a concentraciones menores de proteína (a partir de los 10  $\mu\text{g/mL}$  de ArcA-P) y, además, se observó la formación de un complejo estable a una concentración igual o superior a 40  $\mu\text{g/mL}$  de ArcA-P (carril 6 y 7).

Por su parte, ArcA-P retardó la migración de la sonda LX1, que corresponde a una región más acotada del promotor de *lpxO* que contiene mutaciones en L-ABS1, en presencia de 40  $\mu\text{g/mL}$  de proteína, sin la formación de un complejo estable y manteniendo parte de la sonda libre (**Figura 13C**, panel derecho). A diferencia de LX1, la sonda L1, que corresponde a su contraparte con L-ABS1 inalterado, fue capaz de formar un complejo estable con ArcA-P a la misma concentración de proteína. Cabe mencionar que ArcA no fosforilado no retardó la migración de LX0 y LX1, por lo que esta interacción depende de la fosforilación de la proteína (**Figura 13B y 13C**, paneles derechos).

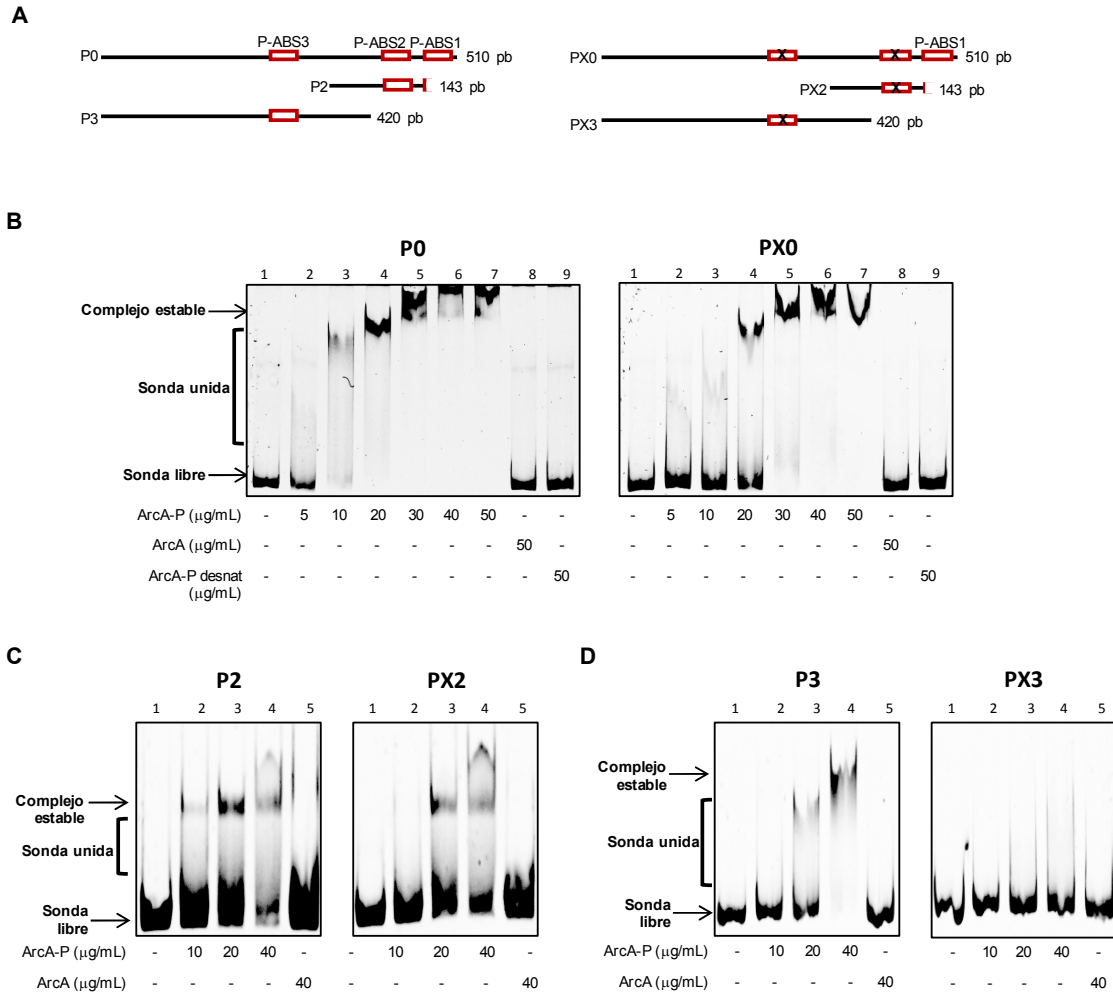


**Figura 13. Las mutaciones puntuales en L-ABS1 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen *lpxO* y ArcA-P *in vitro*.** **A)** Esquematización de las sondas de DNA utilizadas en los ensayos de unión a ArcA *in vitro*. Los recuadros rojos representan los ABS hipotéticos y la "X" señala la mutación del ABS indicado. **B)** EMSA utilizando la sonda que contiene el promotor completo de *lpxO* intacto (L0, panel izquierdo) o con mutaciones en L-ABS1 (LX0, panel derecho). Las sondas L0 y LX0 de 440 pb se incubaron en presencia de cantidades crecientes de ArcA-P (carriles 2-7). Como control negativo, se incubaron las sondas en ausencia de ArcA (carriles 1), en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 8), o de ArcA-P desnatado por calor (carriles 9). **C)** EMSA utilizando las sondas que incluyen sólo un ABS, correspondiente a L-ABS1 intacto (L1, panel izquierdo) o mutado (LX1, panel derecho). Las sondas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-4). Como control negativo se incubaron las sondas en ausencia de ArcA (carriles 1) y en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 5).

En conjunto, estos resultados muestran que la mutación en L-ABS1 disminuye la afinidad del promotor del gen *lpxO* por ArcA-P, ya que las sondas LX0 y LX1, que presentan dicha mutación, no son capaces de formar un complejo estable con la proteína, a diferencia de sus contrapartes L0 y L1 que presentan L-ABS1 sin mutaciones.

Por otra parte, ArcA-P retardó la migración de la sonda PX0 (que incluye mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 en el promotor de *pagP*) formando un complejo estable a concentraciones iguales o superiores a 20  $\mu\text{g/mL}$  de la proteína (**Figura 14B**, panel derecho, carriles 5-7). Al igual que PX0, la sonda P0 formó un complejo estable con ArcA-P a las mismas concentraciones (**Figura 14B**, panel izquierdo, carriles 5-7). Sin embargo, en el caso de P0 no se observó sonda libre bajo esta condición, a diferencia de lo observado para PX0.

De forma similar a PX0, ArcA-P también retardó la migración de la sonda PX2, que incluye sólo el sitio P-ABS2 modificado, formando un complejo estable a concentraciones iguales o superiores a 20  $\mu\text{g/mL}$  de la proteína (**Figura 14C**, panel derecho, carriles 3 y 4). Resultados similares se obtuvieron en los EMSA realizados con la sonda P2, que presenta P-ABS2 intacto (**Figura 14C**, panel izquierdo). Si bien en ambos casos se observó que a 20  $\mu\text{g/mL}$  de ArcA-P se mantiene una fracción de la sonda libre, esta fracción es mayor en el caso de PX2 que en el caso de P2 (comparar carriles 4 de ambos paneles en la **Figura 14C**). Finalmente, ArcA-P no retardó la migración de la sonda PX3, que incluye sólo la mutación en P-ABS3 (**Figura 14D**, panel derecho), a diferencia de lo que se observó para la sonda P3, que contiene P-ABS3 intacto (**Figura 14D**, panel izquierdo). Cabe mencionar que ArcA sin fosforilar no retardó la migración de las sondas PX0, PX2 y PX3 (**Figura 14C** y **14D**, carriles 5), por lo que la fosforilación de ArcA es necesaria para su interacción con estas sondas.



**Figura 14. Las mutaciones puntuales en P-ABS2 y P-ABS3 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen *pagP* y ArcA-P *in vitro*.** **A)** Esquemización de las sondas de DNA P0 y PX0 utilizados en los ensayos de unión a ArcA *in vitro* en B. Los recuadros rojos representan los ABS putativos y los cuadros negros con dos "X" señalan la mutación del ABS indicado. **B)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de las sondas que contiene el promotor completo de *pagP* intacto (P0, panel superior) o con mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 (PX0, panel inferior). Las sondas P0 y PX0 de 510 pb se incubaron en presencia de cantidades crecientes de ArcA-P (carriles 2-7). Como control negativo se incubaron las sondas en ausencia de ArcA (carriles 1), en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 8) o de ArcA-P desnaturalizado por calor (carriles 9). **C)** Esquemización de las sondas de DNA P2 y PX2 utilizadas en los ensayos de unión a ArcA *in vitro* en D. **D)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de las sondas que incluyen sólo P-ABS2 intacto (P2, panel superior) o mutado (PX2, panel inferior). **E)** Esquemización de las sondas de DNA P3 y PX3 utilizadas en los ensayos de unión a ArcA *in vitro* en F. **F)** Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de las sondas que incluyen sólo P-ABS3 intacto (P3, panel superior) o mutado (PX3, panel inferior). Las sondas P2, PX2, P3 y PX3 (**D** y **F**) se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ArcA-P (carriles 2-4). Como control negativo se incubaron las sondas en ausencia de ArcA (carriles 1) y en presencia de ArcA sin fosforilar (carriles 5).



Estos resultados revelan que las mutaciones generadas en P-ABS2 y P-ABS3 disminuyen la afinidad del promotor *pagP* por ArcA-P, ya que las sondas PX0 y PX2 (que incluyen mutaciones en P-ABS2) mantienen una fracción mayor de sonda libre que sus contrapartes intactas, P0 y P2. Finalmente el efecto de la mutación de P-ABS3 sobre la afinidad de la sonda a ArcA-P es muy claro, ya que ArcA-P no retardó la migración de la sonda PX3 que contiene esta mutación, a diferencia de lo observado para P3.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta este punto revelan que ArcA reprime la expresión de *lpxO* y *pagP* en condiciones anaeróbicas de crecimiento mediante su unión directa a los promotores de dichos genes. La mutación de L-ABS1 en el promotor de *lpxO* y de P-ABS2 y P-ABS3 en el promotor de *pagP* reducen la afinidad entre ArcA y estos promotores, lo cual podría repercutir sobre la regulación dependiente de oxígeno de la expresión de estos genes.

#### **III.4. Ensayos de infección de larvas de pez cebra con cepas de *S. Enteritidis***

Para estudiar el efecto de la regulación de la expresión de *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno sobre la virulencia de *S. Enteritidis*, se decidió usar pez cebra como modelo de hospedero. El incremento en el uso de pez cebra para el estudio de su interacción con patógenos, incluyendo a *S. Typhimurium*, ha permitido el establecimiento de este organismo como hospedero alternativo al modelo murino (Tobin et al., 2012; van der Sar et al., 2003; Varas et al., 2017a y 2017b).

Para llevar a cabo los ensayos, se modificó un protocolo previamente desarrollado en el Laboratorio de Microbiología de Sistemas del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Este protocolo consiste en asignar un valor al estado fisiológico de las larvas de pez cebra (**Tabla 4**), tomando en consideración distintos parámetros como la sensibilidad al tacto de su cola, frecuencia cardíaca y flujo sanguíneo.

De esta manera, el valor del índice promedio del estado fisiológico (IPEF) asignado a una población de 10 larvas, y la mortalidad de los individuos infectados, nos permitió monitorear el desarrollo de la infección.

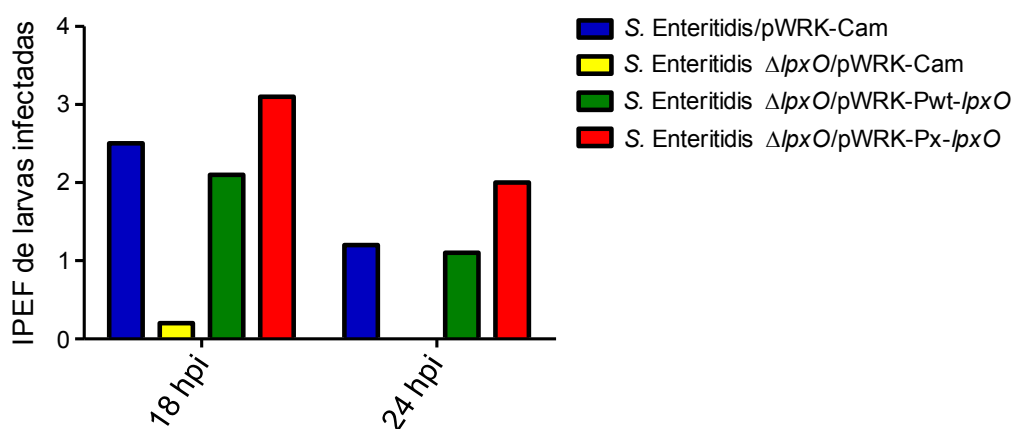
#### **III.4.1. La inactivación del gen *lpxO* en *S. Enteritidis* genera un fenotipo hipervirulento durante la infección en *Danio rerio***

Siendo la primera vez que se utiliza pez cebra como modelo de infección para *S. Enteritidis*, se realizó un primer ensayo exploratorio para determinar la dosis infectiva y los tiempos de monitoreo adecuados. Para esto, 10 larvas de 2 dpf se expusieron a una suspensión de bacterias ajustadas a  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL y  $\sim 2,5 \times 10^9$  UFC/mL.

En este primer ensayo, se utilizó la cepa silvestre (*S. Enteritidis*/pWRK-Cam), la mutante carente del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK-Cam), la mutante con una copia intacta del gen (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_{WT}$ -*lpxO*) y la mutante con una copia de *lpxO* que contiene mutaciones en L-ABS1 (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_X$ -*lpxO*). En estas dos últimas cepas, se realizó la inserción cromosomal de los alelos correspondientes.

Se realizó un primer monitoreo de las larvas a las 18 hpi. A este tiempo todas las larvas infectadas con  $\sim 2,5 \times 10^9$  UFC/mL murieron, salvo las infectadas con la mutante regulatoria de *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_X$ -*lpxO*), las cuales presentaron un 100% de supervivencia a este tiempo (resultados no mostrados). Por otra parte, varias de las larvas infectadas con la menor dosis infectiva ( $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL) sobrevivieron luego de 18 hpi, por lo que fue posible evaluar su estado fisiológico bajo estas condiciones de infección (**Figura 15**). Las larvas infectadas con la cepa silvestre (*S. Enteritidis*/pWRK-Cam) presentaron un IPEF de 2,2, (**Figura 15**, barras azules), con la muerte de 1 individuo (**Tabla 6**), mientras que las larvas infectadas con la cepa carente del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*

$\Delta lpxO/pWRK-Cam$ ) presentaron un IPEF de 0,2 (**Figura 15**, barras amarillas), muy por debajo del obtenido con la cepa silvestre. Este bajo índice se debe tanto a la alta mortalidad de las larvas (**Tabla 6**), como a un estado fisiológico muy deteriorado de los dos individuos sobrevivientes. El IPEF de las larvas infectadas con la cepa mutante que contiene una copia intacta del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$ ) fue de 1,9 (**Figura 15**, barras verdes), lo que indica la complementación del fenotipo en esta cepa. Finalmente, las larvas infectadas con la mutante regulatoria de *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$ ) mostraron un IPEF de 2,7 (**Figura 15**, barras rojas), sin individuos muertos (**Tabla 6**).



**Figura 15. Ensayo preliminar de infección de larvas de pez cebra con cepas de *S. Enteritidis*.** Se realizaron ensayos de infección por inmersión estática utilizando la cepa silvestre para *lpxO* (*S. Enteritidis/pWRK-Cam*, azul), la mutante carente del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-Cam$ , amarillo), la mutante que contiene una copia intacta del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$ , verde) y la mutante regulatoria que contiene una copia de *lpxO* con L-ABS1 mutado (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$ , rojo). Los ensayos se realizaron utilizando una dosis infectiva de  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL y se monitoreó el IPEF de una población de 10 larvas a las 18 y 24 hpi. Al momento de la infección, todas las larvas presentaban un estado fisiológico óptimo (IPEF = 4).

Luego de 24 hpi, se observó que varias larvas infectadas con las cepas *S. Enteritidis/pWRK-Cam*, *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-Cam$  y *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$  habían muerto (**Tabla 6**) y que las sobrevivientes en su mayoría presentaban un IPEF de 1,0, sin reacción al toque de su cola y con ritmo cardíaco

disminuido. En cuanto a las larvas infectadas con la mutante regulatoria *S. Enteritidis*  $\Delta/lpxO/pWRK-P_x-lpxO$ , éstas presentaron una supervivencia del 100% (**Tabla 6**) y un IPEF de 2,0, muy superior a lo evidenciado en las infecciones con las otras cepas (**Figura 15**). Es importante mencionar que se realizó un control de larvas sin infectar, las cuales se mantuvieron en su óptimo estado fisiológico (IPEF = 4), durante todo el tiempo que se llevó a cabo el ensayo.

**Tabla 6.** Supervivencia de larvas de *Danio rerio* infectadas con cepas de *S. Enteritidis*.

Cepa	Porcentaje de supervivencia de larvas infectadas por inmersión	
	18 hpi	24 hpi
<i>S. Enteritidis/pWRK-Cam</i>	90%	80%
<i>S. Enteritidis</i> $\Delta/lpxO/pWRK-Cam$	20%	0%
<i>S. Enteritidis</i> $\Delta/lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$	80%	50%
<i>S. Enteritidis</i> $\Delta/lpxO/pWRK-P_x-lpxO$	100%	100%

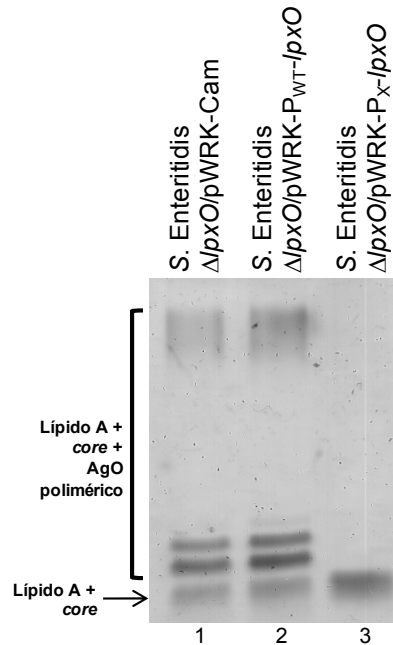
Considerando el deterioro del estado fisiológico de la mayoría de las larvas infectadas, se decidió sacrificarlas y no continuar con el ensayo. No obstante, a partir de este ensayo preliminar se determinó que la dosis infectiva a utilizar debe ser de  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL, ya que a esta dosis observamos diferencias en la virulencia de las cepas. Además, se estableció que sería adecuado realizar monitoreos de las larvas infectadas a tiempos más cortos post infección (se propuso 2, 4 y 6 hpi) con el objetivo de evaluar eventos tempranos que ocurren durante la infección con cepas hipervirulentas, como fue el caso de *S. Enteritidis*  $\Delta/lpxO/pWRK-Cam$ .

Si bien para este ensayo no se incluyeron réplicas biológicas, se puede inferir a partir de los resultados que la cepa que carece del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta/lpxO/pWRK-Cam$ ), y que por lo tanto es incapaz de hidroxilar el lípido A, parece ser hipervirulenta en

comparación con la cepa silvestre (*S. Enteritidis*/pWRK-Cam). Además, considerando que los resultados obtenidos para la cepa silvestre son similares a los obtenidos para la cepa *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_{WT}$ -*lpxO*, se infiere que la restitución de la copia intacta del gen *lpxO* complementó el fenotipo silvestre.

Según lo observado en los ensayos de infección en pez cebra, la cepa de *S. Enteritidis* que contiene el gen *lpxO* con mutaciones en L-ABS1 (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_X$ -*lpxO*) presentó un fenotipo marcadamente atenuado en comparación con las otras cepas ensayadas. Que la desregulación de la expresión de *lpxO* afectara la virulencia de la bacteria estaba dentro de lo esperable. Sin embargo, en esta cepa se observó un marcado defecto en el crecimiento en medio sólido y la generación de agregados bacterianos cuando se creció en medio líquido, lo que sugiere defectos en la envoltura de la bacteria. Esto último nos llevó a cuestionar la identidad de la cepa, por lo que se realizaron ensayos de aglutinación utilizando antisuero O de grupo D1 de *Salmonella*. La mutante regulatoria de *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_X$ -*lpxO*) no sufrió aglutinación en presencia del antisuero, a diferencia de las otras cepas de *S. Enteritidis* (resultados no mostrados). Considerando que este antisuero reconoce el AgO de la bacteria, fue necesario determinar si la bacteria efectivamente producía este dominio del LPS. Para esto, se analizó el perfil electroforético de muestras de su LPS. Como se muestra en la **Figura 16**, la cepa silvestre y la mutante complementada con una copia intacta del gen (*S. Enteritidis*/pWRK-Cam y  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_{WT}$ -*lpxO*) presentaron el perfil electroforético habitual de esta bacteria, caracterizado por moléculas conteniendo lípido A-core unido al AgO, con diferente grado de polimerización. En cambio, la mutante regulatoria *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$ /pWRK- $P_X$ -*lpxO* sólo presentó la especie de mayor movilidad electroforética, correspondiente a un lípido A-core carente de AgO. Un fenotipo con estas características no puede ser atribuido a las modificaciones genéticas realizadas en el

promotor de *lpxO* en esta cepa, por lo que este resultado fue completamente inesperado. Esto nos impidió seguir trabajando con dicha cepa, ya que muchos de los efectos que podríamos observar no podrían ser únicamente atribuibles a la desregulación de la expresión de *lpxO*, sino también a su carencia de AgO (van der Sar *et al.*, 2003) resultante de alguna mutación secundaria desconocida.



**Figura 16. La cepa *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_x-lpxO$  carece de antígeno O.** Perfil electroforético de las especies de LPS obtenidas desde la cepa silvestre (*S. Enteritidis/pWRK-Cam*, carril 1), la mutante  $\Delta lpxO$  con una copia intacta del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$ , carril 2) y la mutante regulatoria que contiene una copia de *lpxO* con L-ABS1 mutado (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_x-lpxO$ , carril 3) crecidas en MME en condiciones aeróbicas.

#### III.4.2. La inactivación del gen *pagP* en *S. Enteritidis* genera un fenotipo atenuado durante la infección de larvas de *Danio rerio*

Previamente, en este trabajo de tesis demostramos que ArcA reprime la expresión de *pagP* en condiciones de crecimiento anaeróbicas en *S. Enteritidis* y que esto ocurre mediante su unión directa a ABS situados en el promotor de este gen. Además, mutaciones en los sitios P-ABS2 y P-ABS3 disminuyen la afinidad de este promotor por ArcA-P. Con el

objetivo de determinar si esta regulación tiene un impacto sobre la virulencia de la bacteria, se llevaron a cabo ensayos de infección en pez cebrá mediante inmersión estática utilizando una mutante regulatoria de *pagP*.

Tomando en consideración los hallazgos realizados en el ensayo preliminar (**sección III.4.1**), para estos experimentos se escogió una dosis infectiva de  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL utilizando la cepa silvestre (*S. Enteritidis/pWRK-Cam*), la mutante carente del gen *pagP* (*S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-Cam$* ), la mutante que contiene una copia intacta del gen *pagP* (*S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$* ) y la mutante que contiene una copia del gen *pagP* con mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 (*S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$* ). En estas dos últimas cepas se realizó la inserción cromosomal de los alelos correspondientes. Para cada ensayo, se tomaron 10 larvas de pez cebrá de 2 dpf y se sumergieron en un pocillo con 8 mL de la suspensión de bacterias.

En primer término, se monitoreó el estado fisiológico de las larvas infectadas a las 2, 4 y 6 hpi; sin embargo, todas presentaron un estado fisiológico óptimo (IPEF = 4) por lo que no se observaron cambios con respecto al momento inicial de infección (resultados no mostrados). Luego de 1 dpi, en algunos casos se logró evidenciar cambios en el estado fisiológico de las larvas con respecto al momento inicial de infección. Por una parte, el IPEF de las larvas infectadas con la cepa silvestre (*S. Enteritidis/pWRK-Cam*) fue de 3,3 luego de 1 dpi (**Figura 17A**, barras azules). Los días posteriores, las larvas infectadas con esta cepa registraron valores de IPEF cercanos al obtenido a 1 dpi, llegando a un valor de 2,3 a los 4 dpi.

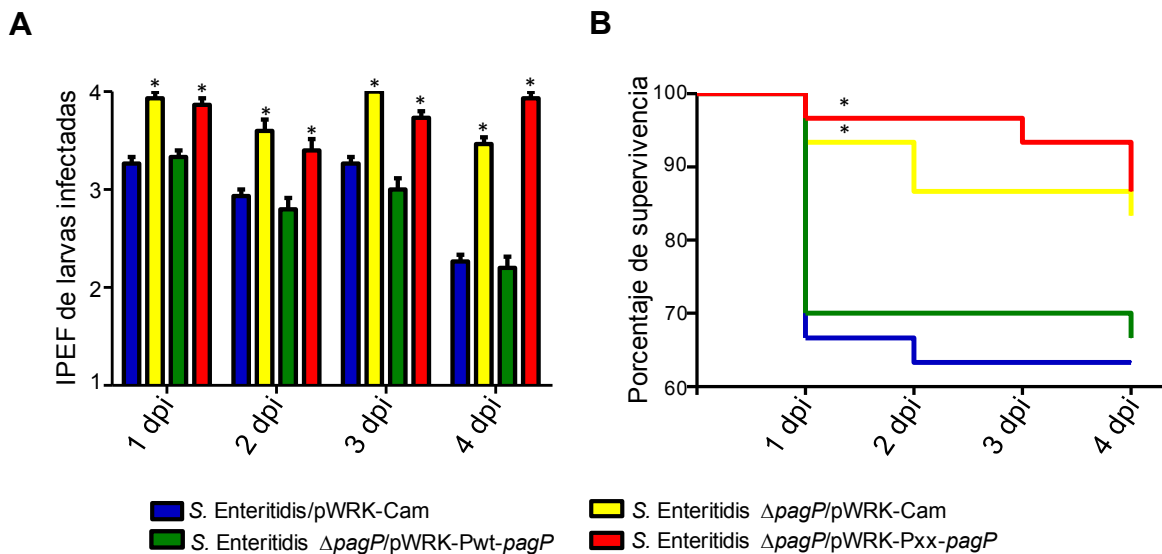
Por su parte, las larvas infectadas con la mutante carente del gen *pagP* (*S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-Cam$* ) presentaban un mejor estado fisiológico que las infectadas con la cepa silvestre luego de 1 dpi, obteniendo un IPEF de 3,7. Además, no se observaron variaciones en este índice a tiempos posteriores post infección (**Figura 17A**, barras amarillas). Estos

resultados muestran que la mutante carente del gen *pagP*, que es incapaz de palmitoilar su lípido A, presentó un fenotipo atenuado en comparación con la cepa silvestre. En cuanto a las larvas infectadas con la cepa mutante que contiene una copia intacta del gen *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$ ), éstas presentaron IPEF de 3,0 a 1 dpi, muy similar al obtenido por la cepa silvestre. Los días posteriores de monitoreo, las larvas infectadas con *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$  registraron valores de IPEF similares a las infectadas con la cepa silvestre (**Figura 17A**, barras verdes), lo que revela que la restitución de una copia intacta del gen *pagP* complementó el fenotipo de la mutante. De manera similar a lo observado en las larvas infectadas con la mutante que carece del gen *pagP*, las larvas infectadas con la mutante regulatoria para este mismo gen (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$ ) presentaron un IPEF de 3,7 a 1 dpi y no se observaron cambios los días posteriores de monitoreo (**Figura 17A**, barras rojas). De estos resultados se desprende que la restitución de una copia del gen *pagP* con mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 no alteró el fenotipo de la cepa mutante. Cabe mencionar que las larvas utilizadas como control sin infectar mostraron un estado fisiológico óptimo (IPEF = 4) durante el transcurso del ensayo.

A diferencia de los resultados obtenidos en la sección anterior (**sección III.4.1**), bajo estas condiciones experimentales no se registró muerte de individuos infectados. Debido a esto, se decidió repetir el ensayo con una dosis infectiva mayor de  $\sim 2,5 \times 10^9$  UFC/mL para evaluar la mortalidad de un total de 30 larvas infectadas por cada cepa de *S. Enteritidis* en estudio. Bajo estas condiciones, se logró observar la muerte de individuos a partir de 1 dpi (**Figura 17B**). En concordancia con los fenotipos recién descritos, las cepas *S. Enteritidis/pWRK-Cam* y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$  (que contienen una copia intacta del gen *pagP*) generaron mayor mortalidad de las larvas infectadas, alcanzando un 66,7% y 70% de supervivencia, respectivamente, a 1 dpi. Por su parte, las cepas que



presentaron un fenotipo atenuado anteriormente, *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -Cam y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -P<sub>XX</sub>-*pagP*, generaron menor mortalidad en las larvas, con altos porcentajes de supervivencia (93,3% y 96,7% respectivamente) a este tiempo. Las diferencias observadas en la virulencia de las cepas se mantuvieron hasta el cuarto día de ensayo.



**Figura 17. La mutante  $\Delta pagP$  de *S. Enteritidis* y la mutante regulatoria para el mismo gen presentan un fenotipo atenuado en ensayos de infección de larvas de pez cebra.** Se realizaron ensayos de infección por inmersión estática utilizando una cepa silvestre para *pagP* de *S. Enteritidis* (*S. Enteritidis/pWRK*-Cam, azul), la mutante carente del gen *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -Cam, amarillo), la mutante que contiene una copia intacta del gen *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -P<sub>WT</sub>-*pagP*, verde) y la mutante regulatoria que contiene una copia de *pagP* con P-ABS2 y P-ABS3 mutados (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -P<sub>XX</sub>-*pagP*, rojo). **A)** IPEF monitoreado cada día post-infección de 10 larvas de pez cebra infectadas con  $\sim 1 \times 10^9$  UFC/mL. Al momento de la infección todas las larvas presentaban un estado fisiológico óptimo (IPEF = 4). La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía para cada tiempo post infección,  $*p < 0,05$  vs. *S. Enteritidis/pWRK*-Cam en el mismo dpi. **B)** Supervivencia de larvas de pez cebra infectadas con  $\sim 2,5 \times 10^9$  UFC/mL. La significancia estadística se determinó mediante la prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon,  $*p < 0,05$  vs. *S. Enteritidis/pWRK*-Cam.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la cepa mutante de *S. Enteritidis* carente del gen *pagP* es atenuada en un modelo de infección de pez cebra por inmersión estática, en comparación con la cepa silvestre. Además, la restitución de una

copia intacta de *pagP* complementa el fenotipo, mientras que la restitución de una copia del gen *pagP* con mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 mantiene el fenotipo atenuado de la mutante. Cabe destacar que esta última observación llamó nuestra atención dado que la mutante regulatoria *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$  presentó el mismo fenotipo que la mutante nula *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-Cam$ , por lo que se decidió caracterizar el perfil electroforético del LPS obtenido desde las cepas en estudio y determinar la actividad del promotor intacto de *pagP* y del promotor mutado en P-ABS2 y P-ABS3. Esto último se realizó ya que la localización de uno de los sitios de unión (P-ABS3) se encuentra parcialmente superpuesto con la caja -10 del promotor de *pagP* (**Figura 6**) y, por lo tanto, al alterar estas secuencias podría afectarse severamente la actividad de dicho promotor.

#### **III.4.3. La mutante regulatoria atenuada *S. Enteritidis* $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ carece de lípido A heptaacilado debido a la inactivación del promotor del gen *pagP***

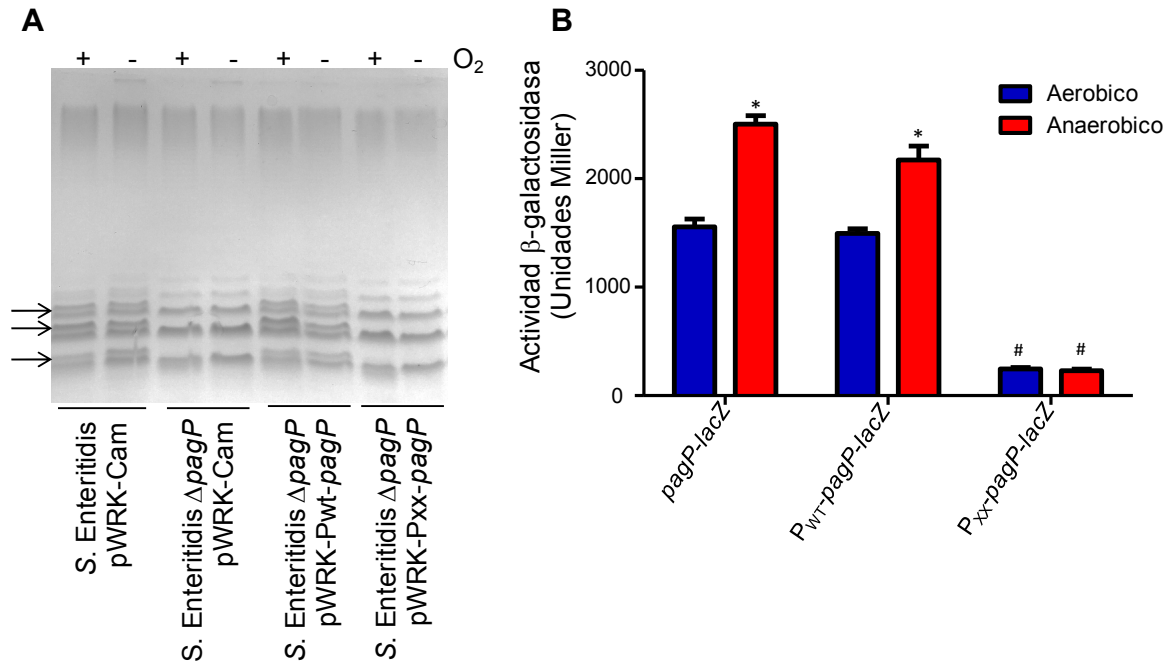
Como se mencionó, la mutante que contiene una copia de *pagP* con mutaciones en P-ABS2 y P-ABS3 (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ ) presentó un fenotipo muy similar al de la mutante nula (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-Cam$ ), lo que sugiere que la mutante regulatoria no expresa el gen *pagP*. Para dilucidar esta interrogante, en primer lugar se evaluó el perfil electroforético de muestras de LPS obtenidas desde las cepas en estudio. Se decidió crecer las cepas en MME, ya que éste simula de mejor manera las condiciones a las cuales se sometieron las bacterias durante el ensayo de infección, en comparación con un medio rico. Además, se extrajo el LPS desde las cepas crecidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, para así determinar la producción de LPS en condiciones en las cuales ArcA está activo o inactivo.

Según se muestra en la **Figura 18A**, en el perfil electroforético del LPS obtenido desde la cepa silvestre (*S. Enteritidis*/pWRK-Cam), las moléculas de mayor movilidad se resuelven como un duplete. Se ha reportado que la banda superior de cada duplete corresponde a LPS con lípido A heptaacilado (Chalabaev *et al.*, 2014). Esto se condice con lo que se observa en el perfil electroforético del LPS de la cepa *S. Enteritidis*  $\Delta pagP$ /pWRK-Cam, ya que ésta no presentó la banda superior de cada duplete, lo que indica que no es capaz de palmitoilar su lípido A debido a la carencia de la palmitoil transferasa PagP (codificada en el gen *pagP*). Por otra parte, la restitución de una copia intacta del gen (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP$ /pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP*) complementó el fenotipo de la mutante, ya que las moléculas de LPS se resolvieron como un duplete, al igual que en el caso de la cepa silvestre. Finalmente, en el perfil electroforético del LPS obtenido desde la mutante regulatoria de *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP$ /pWRK-P<sub>xx</sub>-*pagP*) las moléculas de mayor movilidad no se resolvieron como dupletes por lo que se infiere que esta cepa no presentó especies de LPS con lípido A heptaacilado. Cabe mencionar que la disponibilidad de oxígeno no afectó el perfil electroforético del LPS obtenido de cada cepa.

Teniendo en consideración que la mutante regulatoria (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP$ /pWRK-P<sub>xx</sub>-*pagP*), al igual que la mutante nula para *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP$ /pWRK-Cam), no produce lípido A heptaacilado, se consideró necesario evaluar si la introducción de mutaciones en P-ABS2 y, especialmente, sobre P-ABS3 afectan la actividad del promotor. Para esto, se construyeron fusiones transcripcionales *pagP-lacZ* en los diferentes alelos de *pagP* clonados en los plasmidios pWRK-Cam e insertos en el cromosoma. Así, mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas que poseen dichas fusiones, se pudo evaluar la expresión del reportero *lacZ* comandada por el promotor intacto de *pagP* o por el promotor mutado en los ABS.

Según se muestra en la **Figura 18B**, la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa de *S. Enteritidis* que presentó la fusión bajo el control del promotor intacto de *pagP* ( $P_{WT-pagP-lacZ}$ ) fue similar a la observada en la fusión construida sobre la cepa silvestre (*pagP-lacZ*), tanto en condiciones de crecimiento aeróbicas como anaeróbicas. Estos resultados corroboran la complementación del fenotipo observado anteriormente en la cepa *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$ , en términos de la producción de especies de LPS (**Figura 18A**) y de su virulencia (**Figura 17**). Sin embargo, la cepa que contenía la fusión bajo el control del promotor mutado en P-ABS2 y P-ABS3 ( $P_{XX-pagP-lacZ}$ ) presentó una actividad  $\beta$ -galactosidasa significativamente menor a las otras cepas ensayadas, que no varió en respuesta a la disponibilidad de oxígeno (**Figura 18B**). Este resultado nos llevó a concluir que las mutaciones realizadas sobre en P-ABS2 y P-ABS3 inactivaron al promotor *pagP*, impidiendo su expresión.

Este hallazgo nos permitió explicar por qué la mutante regulatoria *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$  presenta un fenotipo similar al de la mutante nula (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-Cam$ ), en cuanto a la producción de especies de LPS (**Figura 18A**) y a su virulencia en los ensayos de infección en pez cebra (**Figura 17**).



**Figura 18. La cepa *S. Enteritidis*  $\Delta$ pagP/pWRK-Pxx-pagP no expresa *pagP*.** **A)** Perfil electroforético de especies de LPS obtenidas desde cultivos de *S. Enteritidis* crecidos en MME en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las flechas indican las bandas superiores de las especies que se resuelven como dupletes, las cuales contienen lípido A heptaacilado. **B)** Evaluación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas de *S. Enteritidis* que contiene la fusión *pagP-lacZ* en un fondo genético silvestre (*pagP-lacZ*), o que contienen esta fusión en el alelo clonado en pWRK, ya sea bajo el control del promotor intacto de *pagP* (*P<sub>WT</sub>-pagP-lacZ*) o del promotor mutado en los ABS (*P<sub>xx</sub>-pagP-lacZ*). Para esta medición, las cepas se crecieron en MME en condiciones aeróbicas (azul) y anaeróbicas (rojo). Para la comparación entre ambas condiciones de crecimiento de una misma cepa (aeróbico vs. anaeróbico) se determinó la significancia estadística mediante la prueba t de Student, \* $p < 0,05$  vs. la misma cepa crecida en condiciones aeróbicas. Para la comparación entre las diferentes cepas bajo una misma condición de crecimiento se determinó la significancia estadística mediante la prueba ANOVA de una vía, # $p < 0,05$  vs. la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones.

## IV. DISCUSIÓN

El LPS es el mayor componente de la superficie de bacterias Gram negativo, por lo que también es un importante mediador de las interacciones con el hospedero durante la infección. El LPS se reconoce como una molécula dinámica, capaz de modificar algunas de sus características en respuesta a las condiciones ambientales que detectan las bacterias (Rietschel *et al.*, 1994; Raetz *et al.*, 2007). Dentro de las modificaciones que puede sufrir el LPS en respuesta a las condiciones ambientales, son las modificaciones en el lípido A las que reciben mayor atención debido al impacto que éstas presentan sobre el ciclo infeccioso de diversos patógenos.

Estas modificaciones pueden ser clasificadas en dos tipos: las modificaciones sobre los grupos fosfatos del lípido A y las modificaciones sobre las cadenas aciladas que presenta esta molécula. Las primeras tienen el objetivo de enmascarar las cargas negativas de los grupos fosfato, lo que confiere a las bacterias una mayor resistencia a CAMP, mediadores de la inmunidad innata en diversos hospederos (Guo *et al.*, 1997; Raetz *et al.*, 2007). Este es un mecanismo conservado utilizado por muchos patógenos bacterianos, como *S. Typhimurium*, *Francisella novicida*, *Bordetella brochiseptica*, *Helicobacter pylori* y *Pseudomona aeruginosa*, entre otros, para aumentar su supervivencia dentro del organismo hospedero (Gunn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Moskowitz *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2008). Por otra parte, las modificaciones a nivel de las cadenas del lípido A pueden ser por hidroxilación de éstas, desacilación o acilación secundaria del lípido A. Estos cambios ayudan a evadir el reconocimiento del lípido A por parte de receptores TLR4, lo cual genera una disminución de la respuesta inflamatoria, mecanismo comúnmente utilizado por el hospedero para lograr la eliminación del patógeno (Guo *et al.*, 1997; Raetz *et al.*, 2007). Cabe mencionar que algunas modificaciones en las

cadena acilada del lípido A, como la desacilación por PagL o la palmitoilación por PagP, también aumentan la resistencia a CAMP debido a que disminuyen la permeabilidad de la membrana externa (Guo *et al.*, 1998). En el caso particular de *Salmonella*, varias de estas modificaciones sobre el lípido A son reguladas por factores ambientales. En este contexto, es sabido que la expresión de varios de los genes que codifican las enzimas modificadoras del lípido A es regulada directa (*pagL* y *pagP*) o indirectamente (*arnT* y *eptA*) por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Gunn *et al.*, 2000). El sistema PhoP/PhoQ se activa en condiciones de pH moderadamente ácido y baja disponibilidad de cationes divalentes, condición que se asemeja al interior de la SCV.

Si bien las modificaciones que sufre el lípido A en un contexto ambiental que simula el interior de la SCV han sido ampliamente estudiadas (revisado en Simpson & Trent, 2019), las modificaciones de esta molécula en respuesta a otros microambientes que *Salmonella* enfrenta durante su ciclo infeccioso no han sido exploradas a cabalidad. Tal es el caso del lumen intestinal, en el cual *Salmonella* se expone a una alta osmolaridad y una baja tensión de oxígeno. Considerando que *Salmonella* cuenta con varios reguladores capaces de detectar las variaciones en la disponibilidad de oxígeno (Bauer *et al.*, 1999), éstos podrían ser utilizados por la bacteria para modificar su lípido A, con el objetivo de llevar a cabo más eficientemente la infección.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que varios genes involucrados en la dinámica estructural del LPS son regulados por la disponibilidad de oxígeno y que, en muchos de estos casos, esta regulación se produce en forma dependiente de la presencia del factor transcripcional Fnr. En este sentido, dentro de este trabajo de tesis se demostró que los promotores de los genes *wbaB*, *wzy*, *wzz<sub>SE</sub>*, *wzz<sub>iepE</sub>*, *eptA*, *eptB*, *lpxO* y *lpxR* presentan FBS hipotéticos (**Figuras 6 y 19**) y que además, estas regiones interaccionan con FnrD154A *in vitro* (**Figuras 9 y 11**). Estas evidencias sugieren fuertemente que los FBS

identificados en los promotores de estos genes serían funcionales, indicando que Fnr los regula directamente. Cabe mencionar que las secuencias nucleotídicas de reconocimiento de Fnr, tanto en *E. coli* (Partridge *et al.*, 2008) como en *S. Typhimurium* (Fink *et al.*, 2007), se caracterizan por ser palindrómicas y carecer de nucleótidos altamente conservados, lo que dificulta la identificación de nucleótidos cruciales para la interacción entre este factor transcripcional y el DNA. Por este motivo, los EMSA en presencia de FnrD154A siempre se llevan a cabo en presencia de un DNA competidor que carece de FBS hipotéticos (Lazazzera *et al.*, 1993; Partridge *et al.*, 2008), a diferencia de los ensayos realizados con ArcA-P (Mika & Hengge, 2015), debido a la baja especificidad que presenta la interacción entre Fnr y los sitios FBS.

Resultados no publicados de nuestro laboratorio establecieron, mediante ensayos de qRT-PCR, que la disponibilidad de oxígeno afecta la expresión de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS. Sin embargo, en ese estudio no se logró establecer cuál es el rol de ArcA en este proceso debido a dificultades técnicas. Lo anterior se debió a que no se pudo identificar un gen *housekeeping* para los experimentos de qRT-PCR en la mutante  $\Delta arcA$ . Sin embargo, mediante la construcción de fusiones transcripcionales utilizando el gen reportero *lacZ*, se demostró que ArcA sería un importante represor de la expresión de los genes *lpxO* y *pagP* en condiciones de crecimiento anaeróbicas (**Figura 12**). Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe el rol de ArcA sobre la regulación de la expresión de genes involucrados en la modificación del lípido A en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.

En este trabajo también demostramos que los promotores de algunos genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS (incluidos los de *lpxO* y *pagP*) presentan ABS hipotéticos (**Figuras 6 y 19**). Cabe destacar que la ubicación de los ABS dentro de los promotores de *lpxO* y *pagP* es similar a la que presentan algunos genes cuya expresión es



reprimida por ArcA en condiciones de crecimiento anaeróbico, como es el caso de los operones *cyd* y *cyo* (Salmon *et al.*, 2005). Además, se estableció que estas regiones promotoras interactúan con ArcA-P *in vitro* (**Figuras 7, 8 y 10**), lo cual sugiere que estos ABS son funcionales. Incluso, establecimos que los ABS mayormente implicados en esta interacción son L-ABS1 en el caso del gen *lpxO* y P-ABS2 y P-ABS3 en el caso de *pagP* (**Figuras 7C y 8C**). Para establecer más claramente la participación de estos ABS en la interacción de ArcA-P con estas regiones promotoras, se mutaron dos nucleótidos de estos ABS, correspondientes a una guanina y un timina ubicadas en las posiciones 2 y 3 de cada ABS (Evans *et al.*, 2011). Previamente se había reportado, mediante experimentos de *footprinting*, que la mutación de estos nucleótidos inhibía la interacción proteína-DNA en *E. coli* (Park *et al.*, 2013). Así, demostramos que la mutación puntual de estos ABS en los promotores de *lpxO* y *pagP* disminuyen la afinidad de ArcA-P por estos promotores (**Figuras 13 y 14**). Lo anterior sugiere fuertemente que ArcA ejerce su rol como represor de la expresión de *lpxO* y *pagP* mediante interacción directa con sus promotores.

Con el objetivo de estudiar el impacto de la regulación de la expresión de *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno ejercida por ArcA sobre la producción de LPS y la virulencia de *S. Enteritidis*, se construyeron mutantes regulatorias para *lpxO* y *pagP*. Estas mutantes contenían un alelo del gen controlado por el promotor intacto ( $P_{WT-lpxO}$  y  $P_{WT-pagP}$ ) o por el promotor mutado en L-ABS1 en el caso de *lpxO* ( $P_X-lpxO$ ), o P-ABS2 y P-ABS3 en el caso de *pagP* ( $P_{XX-pagP}$ ). Estos alelos fueron clonados en el plasmidio pWRK-Cam que contiene el gen de la integrasa del fago Gifsy-1, la cual permite la inserción del plasmidio en el cromosoma de la bacteria. Para asegurar que la expresión de *lpxO* o *pagP* ocurriera sólo a partir de los alelos incluidos en los plasmidios derivados de pWRK-Cam, fue necesario realizar esta construcción en cepas de *S. Enteritidis* con fondo genético  $\Delta lpxO$  o  $\Delta pagP$ , según corresponda. Si bien se logró la construcción de estas cepas (**Figuras 20 a**

23), ambas mutantes regulatorias (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_x-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ ) presentaron problemas, lo que no nos permitió abarcar este objetivo. Por una parte, la mutante *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_x-lpxO$  sufrió la pérdida de su AgO (**Figura 16**), probablemente debido a una mutación secundaria ocurrida al azar en algún *locus* desconocido del genoma. Debido a lo anterior, y considerando que muchos de los cambios observados en cuanto a su virulencia podrían deberse a la pérdida de este dominio del LPS (van der Sar *et al.*, 2003) y no a la alteración en la regulación de la expresión de *lpxO*, fue imposible trabajar con ella. En cuanto a la mutante *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ , por otra parte, se observó que no sintetizaba lípido A heptaacilado y no expresaba el gen *pagP* (**Figura 18**). Este resultado fue inesperado, ya que P-ABS3 se sitúa sobre la caja -10 hipotética del promotor *pagP* (**Figuras 6 y A5**), lo que sugiere que el mecanismo de represión de ArcA-P consiste en imposibilitar la unión de la polimerasa al promotor. En este contexto, es importante mencionar que la mutación en P-ABS3 se realizó inmediatamente río arriba de la caja -10 hipotética, lo que podría afectar la función de esta caja y, por ende, la unión de la polimerasa al promotor de *pagP*, impidiendo su transcripción en la mutante regulatoria *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ . Lo anterior explicaría por qué la mutante regulatoria presentó un comportamiento similar a la mutante nula para *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-Cam$ ) en los ensayos de infección de pez cebra (**Figura 17**).

Como se ha mencionado, el uso de modelos hospederos alternativos para estudiar la virulencia de bacterias patógenas se ha incrementado en los últimos años. Así surge el modelo de pez cebra, el cual fue utilizado en esta tesis. Este modelo, a diferencia de otros modelos alternativos, tiene la ventaja que desarrolla su sistema inmune innato tempranamente y las larvas responden a patógenos desde el primer día post fertilización (Herbomel *et al.*, 1999; Le Guyader *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, y tomando en cuenta que las modificaciones en el lípido A afectan principalmente la interacción con componentes

de la inmunidad innata del hospedero, se decidió utilizar este modelo para el estudio de la patogenicidad de *S. Enteritidis* en este trabajo de tesis.

Las infecciones realizadas en larvas de pez cebra con cepas de *S. Enteritidis*, dan cuenta que las modificaciones del lípido A, catalizadas por LpxO y PagP, afectan diferencialmente la virulencia de la bacteria en este modelo. Por una parte, la ausencia del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *lpxO*/pWRK-Cam) al parecer aumenta la virulencia de la bacteria; sin embargo, es necesario realizar más réplicas de este ensayo para confirmarlo (**Figura 15, Tabla 6**). En concordancia con estos resultados, en el marco de su trabajo de Memoria de Título realizada en nuestro laboratorio, Andrea Avilés ha observado comportamientos similares en la mutante isogénica  $\Delta$ *lpxO* de *S. Enteritidis*. Por otra parte, la mutante que carece del gen *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP*/pWRK-Cam) y la mutante regulatoria incapaz de expresar dicho gen (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP*/pWRK-P<sub>xx</sub>-*pagP*), resultan atenuadas en este modelo (**Figura 17**). Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe un efecto de las modificaciones en lípido A sobre la patogenicidad de *S. Enteritidis* en pez cebra, en un estado de desarrollo en el cual el hospedero sólo presenta sistema inmune innato.

Anteriormente, Sepulcre *et al.* (2009) observaron que los receptores TLR4 de leucocitos de pez cebra no reconocen LPS o lípido A de diferentes serovares de *Salmonella*. Sin embargo, se debe considerar que existen diferencias sustanciales en los ensayos realizados en dicho estudio y los realizados en esta tesis. En primer lugar, ellos realizaron ensayos de estimulación sobre leucocitos totales aislados desde peces cebra adulto, mientras que nosotros trabajamos con los individuos completos, que además eran larvas de 2 dpf, las cuales no han desarrollado su sistema inmune adaptativo. Por otra parte, Sepulcre *et al.*, (2009) desafiaron a los leucocitos con LPS (con y sin AgO) y lípido A purificados desde *S. Typhimurium*, mientras que nosotros expusimos a las larvas a las

bacterias con las mutaciones de interés, por lo que no podemos descartar que algún otro componente de la bacteria pueda ayudar en este proceso de interacción patógeno-hospedero.

A pesar que sólo podemos especular sobre las razones por las cuales estas modificaciones sobre el lípido A pueden afectar la virulencia de *S. Enteritidis* en pez cebra, se ha establecido que las modificaciones de cadenas catalizadas por LpxO y PagP impactan directamente sobre la virulencia de varios patógenos Gram negativo (revisado en Needham & Trent, 2013). Por ejemplo, se ha observado en *Klebsiella pneumoniae* que la hidroxilación del lípido A es importante para la infección de pulmón en murinos (Llobet *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que una mutante  $\Delta$ lpxO de *S. Typhimurium* es deficiente en su capacidad de invadir células epiteliales, sobrevivir dentro de macrófagos y colonizar el intestino en un modelo de colitis murino (Moreira *et al.*, 2013). En este contexto, en nuestro laboratorio hemos evidenciado que la infección de macrófagos murinos con una mutante  $\Delta$ lpxO de *S. Enteritidis* genera una mayor secreción de IL-6 en comparación con la cepa silvestre (Amaya, 2018). Considerando los antecedentes expuestos y los resultados obtenidos en nuestros ensayos de infección (**Figura 15**), podríamos especular que la ausencia de hidroxilación del lípido A en la mutante *S. Enteritidis*  $\Delta$ lpxO/pWRK-Cam podría exacerbar la respuesta inflamatoria del hospedero, llevando a la muerte de la larva, lo que explicaría el fenotipo hipervirulento de esta cepa.

Por otra parte, se ha reportado que una mutante de *S. Typhimurium* incapaz de modificar el patrón de acilación del lípido A es atenuada en un modelo murino cuando es administrada por vía oral (Kong *et al.*, 2012) y que la palmitoilación del lípido A de esta bacteria (catalizada por PagP) disminuye la habilidad de inducir la señalización mediada por TLR4 (Kawasaki *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2012). Observaciones similares se han realizado en *Legionella pneumophila* y *B. bronchiseptica*, ya que ambas bacterias

patógenas requieren de la palmitoilación de su lípido A para llevar a cabo la infección en hospederos animales (Robey *et al.*, 2001; Piliore *et al.*, 2004). Además de su rol en la evasión del reconocimiento por TLR4 (Kawasaki *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2012), se ha demostrado que la palmitoilación del lípido A también disminuye la fluidez de la membrana, haciéndola más susceptible a CAMP (Guo *et al.*, 1998). Esto último podría explicar por qué la mutante *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK$ -Cam presenta un fenotipo atenuado en la infección de pez cebra en comparación con la cepa silvestre (**Figura 17**).

Si bien aún no logramos establecer la importancia de la regulación de la expresión de *lpxO* y *pagP* dependiente de oxígeno, creemos que debe existir una regulación fina de la expresión de estos genes durante el ciclo infeccioso de *Salmonella*. En el marco de su trabajo de tesis, Fernando Amaya observó que una mutante que sobreexpresa *lpxO* y que presenta su lípido A totalmente hidroxilado, es deficiente en cuanto a su supervivencia dentro de macrófagos y colonización sistémica en un modelo murino (Amaya, 2018). Lo anterior da cuenta de lo importante que es la estricta regulación de la expresión de *lpxO* en el contexto de la infección. En este sentido, y considerando que la hidroxilación del lípido A catalizada por LpxO requiere de oxígeno como sustrato (Gibbons *et al.*, 2000), resulta lógico pensar que la expresión del gen que codifica esta enzima sea reprimido en condiciones en las cuales no está presente el sustrato.

Por su parte, la expresión de *pagP* es inducida por el factor transcripcional PhoP en condiciones que imitan el ambiente al interior de la SCV (Guo *et al.*, 1998). Cabe destacar que esta es la primera vez que se describe la existencia de un mecanismo de represión de la expresión de este gen. Lo anterior podría dar cuenta de una fina regulación de la expresión del gen *pagP* que podría responder a la temporalidad del ciclo infeccioso en el cual se encuentra *Salmonella*. En otras palabras, si bien la expresión de *pagP* es necesaria al interior de la SCV, la represión de su expresión dentro del lumen intestinal también podría

ser ventajosa para llevar a cabo una infección eficiente. En este contexto, se ha reportado que los serovares no tifoideos de *Salmonella*, como *S. Enteritidis*, gatillan una fuerte respuesta inflamatoria en el intestino de su hospedero. Este aumento en la inflamación genera un nicho que contiene sustratos que pueden ser utilizados por *Salmonella*, pero no por bacterias de la microbiota del hospedero, lo que le confiere una ventaja adaptativa bajo estas condiciones (Rivera-Chávez & Bäumler, 2015). Por lo tanto, considerando que LpxO y PagP reducen la respuesta inflamatoria del hospedero durante el ciclo infeccioso de *Salmonella*, es concebible pensar que su expresión debe ser reprimida en condiciones de baja tensión de oxígeno dentro del intestino.

## V. CONCLUSIONES

- Algunos genes involucrados en la biosíntesis (*wbaB*, *waaL*, *wzy*, *wzz<sub>SE</sub>* y *wzz<sub>repE</sub>*) y modificación del LPS (*eptA*, *eptB*, *lpxO*, *lpxR* y *pagP*), cuya expresión es modulada por la disponibilidad de oxígeno en *S. Enteritidis*, presentan sitios funcionales de unión a ArcA y/o Fnr en su región promotora, lo que sugiere que estos factores transcripcionales regulan directamente la expresión de estos genes.
- ArcA reprime la expresión de *lpxO* y *pagP* en condiciones anaeróbicas de crecimiento mediante su interacción directa con la región promotora de estos genes en *S. Enteritidis*.
- Fnr reprime la expresión de *lpxO* en condiciones anaeróbicas de crecimiento mediante su interacción directa con la región promotora de este gen en *S. Enteritidis*.
- *S. Enteritidis* es capaz de infectar larvas de *Danio rerio* mediante inmersión estática.
- Una mutante de *S. Enteritidis* que carece de lípido A palmitoilado presenta un fenotipo de virulencia atenuado durante la infección de larvas de *Danio rerio*.

Por lo tanto, los factores transcripcionales Fnr y ArcA regulan directamente la expresión de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS, la cual constituye un aspecto importante en el proceso infeccioso de *S. Enteritidis*.

## VI. REFERENCIAS

1. Amaya, Fernando (2018). "Efecto de la hidroxilación del lípido A de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sobre la interacción con macrófagos murinos y la virulencia *in vivo*". Memoria para optar al Título de Bioquímico y Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.
2. Arends J, Thomanek N, Kuhlmann K, Marcus K, Narberhaus F (2016). *In vivo* trapping of FtsH substrates by label-free quantitative proteomics. *Proteomics*, 16(24):3161-3172.
3. Bastin DA, Stevenson G, Brown PK, Haase A, Reeves PR (1993). Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol Microbiol*, 7:725-734.
4. Batchelor RA, Alifano P, Biffali E, Hull SI, Hull RA (1992). Nucleotide sequences of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (*rol*) from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: protein homology and functional complementation. *J Bacteriol*, 174:5228-5236.
5. Bauer CE, Elsen S, Bird TH (1999). Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu Rev Biochem*, 53:495-523.
6. Becker S, Holighaus G, Gabrielczyk T, Uden G (1996). O<sub>2</sub> as the regulatory signal for FNR- dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178:4515-4521.
7. Bittner M, Saldías S, Altamirano F, Valvano MA, Contreras I (2004). RpoS and RpoN are involved in the growth-dependent regulation of *rfaH* transcription and O antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microb Pathog*, 36(1):19-24.
8. Blanc-Potard, AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 181:998-1004.
9. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, 38:2465-2467.
10. Bravo D, Silva C, Carter JA, Hoare A, Alvarez SA, Blondel CJ, Zaldivar M, Valvano MA, Contreras I (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J Med Microbiol*, 57:938-946.
11. Bravo D, Hoare A, Silipo A, Valenzuela C, Salinas C, Alvarez SA, Molinaro A, Valvano MA, Contreras I (2011). Different sugar residues of the lipopolysaccharide outer core are required for early interactions of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium with epithelial cells. *Microb Pathog*, 50(2):70-80.
12. Burlage RS, Atlas R, Stahl D, Saylor G, Geesey G (1998). *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press. New York.
13. Caroff M, Karibian D (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*, 338:2431-2447.
14. Chalabaev S, Chauhan A, Novikov A, Iyer P, Szczesny M, Beloin C, Caroff M, Ghigo JM (2014). Biofilms formed by Gram-negative bacteria undergo increased lipid a palmitoylation, enhancing *in vivo* survival. *mBio*, 5(4):e01116-14.



15. Cherepanov PP, Wackernagel W (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1):9-14.
16. Compan I, Touati D (1994). Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA. *Mol Microbiol*, 11:955-964.
17. Contreras I, Obreque V, Blanco L, Toro CS, Mora GC (1995). Anaerobically-induced *Salmonella* Typhi genes are involved in entry to and proliferation within human-derived cell lines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 26:110-117.
18. Contreras I, Toro CS, Troncoso G, Mora GC (1997). *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiol*, 143:2665-2672.
19. Coombes JL, Robey EA (2010). Dynamic imaging of host-pathogen interactions *in vivo*. *Nat Rev Immunol*, 10 (2010):353-364.
20. Corcoran CP, Podkaminski D, Papenfort K, Urban JH, Hinton JC, Vogel J (2012). Superfolder GFP reporters validate diverse new mRNA targets of the classic porin regulator, MicF RNA. *Mol Microbiol*, 84:428-445.
21. Cronan JE (2003). Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol*, 57:203-224.
22. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6640-6645.
23. Delgado MA, Mouslim C, Groisman EA (2006). The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol*, 60:39-50.
24. Dorman CJ, Chatfield S, Higgins CF, Hayward C, Dougan G (1989). Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect Immun*, 57:2136-2140.
25. Ellermeier CD, Janakiraman A, Slauch JM (2002). Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene*, 290(1-2):153-161.
26. Ellermeier JR, Slauch JM (2007). Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol*, 10:24-29.
27. Evans MR, Fink RC, Vázquez-Torres A, Porwollik S, Jones-Carson J, McClelland M, Hassan HM (2011). Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiol*, 11:58.
28. Everest P, Wain J, Roberts M, Rook G, Dougan G (2001). The molecular mechanism of severe typhoid fever. *Trends Microbiol*, 9:316-320.
29. Farizano JV, Pescaretti ML, López FE, Hsu FF, Delgado MA (2012). The PmrAB system-inducing conditions control both lipid A remodeling and O-antigen length distribution, influencing the *Salmonella* Typhimurium-host interactions. *J Biol Chem*, 287:38778-38789.
30. Fink RC, Evans MR, Porwollik S, Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Troxell B, Libby SJ, McClelland M, Hassan HM (2007). Fnr is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028s).

- J Bacteriol*, 189:2262-2273.
31. Fraenkel DG, Vinopal RT (1973). Carbohydrate metabolism in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 27:69-100.
  32. Galán JE (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol*, 2:46-50.
  33. Garcia-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:10544-10548.
  34. García Véscovi E, Soncini FC, Groisman EA (1996). Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84:165-174.
  35. Gibbons HS, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR (2000). Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe<sup>2+</sup>/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J Biol Chem*, 275:32940-32949.
  36. Gibbons HS, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR (2005). Role of Mg<sup>2+</sup> and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol*, 55(2):425-440.
  37. Gibbons HS, Reynolds CM, Guan Z, Raetz CR (2008). An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry*, 47:2814-2825.
  38. Green J, Paget MS (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol*, 2:954-966.
  39. Groisman EA (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol*, 183:1835-1842.
  40. Guard-Petter J (2001). The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ Microbiol*, 3:421-430.
  41. Gunn JS, Miller SI (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol*, 178:6857-6864.
  42. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol*, 27(6):1171-1182.
  43. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 68:6139-6146.
  44. Gunn JS (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*, 16:284-290.
  45. Gunsalus RP. (1992). Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol*, 17:7069-7074.
  46. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*, 276:250-253.

47. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI (1998). Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, 95:189-198.
48. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*, 6:53-66.
49. Hébrard M, Kröger C, Sivasankaran SK, Händler K, Hinton JC (2011). The challenge of relating gene expression to the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Biotechnol*, 22(2):200-210.
50. Herbomel P, Thisse B, Thisse C (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*, 126:3735-3745.
51. Hoare A, Bittner M, Carter J, Alvarez S, Zaldívar M, Bravo D, Valvano MA, Contreras I (2006). The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect Immun*, 74(3):1555-1564.
52. Ilg K, Endt K, Misselwitz B, Stecher B, Aebi M, Hardt WD (2009). O-antigen-negative *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is attenuated in intestinal colonization but elicits colitis in streptomycin-treated mice. *Infect Immun*, 77:2568-2575.
53. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhachack LG, Cezairliyan BO, Ausubel FM (2010). Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog*, 6:e1000982.
54. Iuchi S, Lin EC (1988). *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:1888-1892.
55. Iuchi S, Matsuda Z, Fujiwara T, Lin EC (1990). The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arcA* modulon. *Mol Microbiol*, 4:715-727.
56. Jault C, Pichon L, Chluba J (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol Immunol*, 40:759-771.
57. Jeon Y, Lee YS, Han JS, Kim JB, Hwang DS (2001). Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem*, 276:40873-40879.
58. Kanther M, Rawls JF (2010). Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Curr Opin Immunol*, 22:10-19.
59. Kato A, Groisman EA (2004). Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev*, 18:2302-2313.
60. Kawano M, Manabe T, Kawasaki K (2010). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. *FEBS Lett*, 584(1):207-212.
61. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI (2004). 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 279(19):20044-20048.

62. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. (2005). Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Endotoxin Res*, 11:57-61.
63. Kawasaki K, China K, Nishijima M (2007). Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 189(13):4911-4919.
64. Kawasaki K, Teramoto M, Tatsui R, Amamoto S (2012). Lipid A 3'-O-deacylation by *Salmonella* outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4. *Biochem Biophys Res Commun*, 428:343-347.
65. Kiley PJ, Beinert H (1998) Oxygen sensing by the global regulator, Fnr: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev*, 22:341-352.
66. Klein G, Raina S (2015). Regulated control of the assembly and diversity of LPS by noncoding sRNAs. *Biomed Res Int*, 2015:153561.
67. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Wang S, Alamuri P, Raetz CR, Curtiss R 3rd (2012). Phosphate groups of lipid A are essential for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity. *Infect Immun*, 80(9):3215-3224.
68. Landini P, Zehnder AJ (2002). The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol*, 184(6):1522-1529.
69. Lazizzera BA, Bates DM, Kiley PJ (1993). The activity of the *Escherichia coli* transcription factor Fnr is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev*, 7:1993-2005.
70. Le Guyader D, Redd MJ, Colucci-Guyon E, Murayama E, Kissa K, Briolat V, Mordelet E, Zapata A, Shinomiya H, Herbomel P (2008). Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*, 111:132-141.
71. Lee CA, Falkow S (1990). The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:4304-4308.
72. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol*, 182:771-781.
73. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA (2004). The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 186(13):4124-4133.
74. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, Cano V, Pérez-Gutiérrez C, Frank CG, Fernández-Carrasco H, Insua JL, Salminen TA, Garmendia J, Bengoechea JA (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(46):E6369-6378.
75. Lu S, Killoran PB, Fang FC, Riley LW (2002). The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun*, 70:451-461.
76. Maeshima N, Fernandez RC (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:3.

77. Maloy SR (1990). *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Jones and Bartlett Publishers. Boston.
78. Marolda CL, Lahiry P, Vinés E, Saldías S, Valvano MA (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol*, 347:237-252.
79. Marr N, Tirsoaga A, Blanot D, Fernandez R, Caroff M (2008). Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in *Bordetella* lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. *J Bacteriol*, 190(12):4281-90.
80. Mika F, Hengge R (2015). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev*, 19:2770-2781.
81. Miller J (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
82. Miller SI, Ernst RK, Bader MW (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*, 3(1):36-46.
83. Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, Callaghan M, Nurisso A, D'Errico G, Zamyatina A, Peri F, Berisio R, Jerala R, Jiménez-Barbero J, Silipo A, Martín-Santamaría S (2015). Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chemistry*, 21:500-519.
84. Moreira CG, Herrera CM, Needham BD, Parker CT, Libby SJ, Fang FC, Trent MS, Sperandio V (2013). Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:1470-1475.
85. Murata T, Tseng W, Guina T, Miller SI, Nikaïdo H (2007). PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 189:7213-7222.
86. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol*, 186(2):575-579.
87. Murray GL, Attridge SR, Morona R (2003). Regulation of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol*, 47:1395-1406.
88. Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA (2003). Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J Immunol*, 170:5203-5209.
89. Needham BD, Trent MS (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 11(7):467-481.
90. Nevola JJ, Stocker BA, Laux DC, Cohen PS (1985). Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella* Typhimurium strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect Immun*, 50:152-159.
91. Nikaïdo H, Vaara M (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, 49:1-32.
92. Nishino K, Hsu FF, Turk J, Cromie MJ, Wösten MM, Groisman EA (2006). Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella*

- PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol*, 61:645-654.
93. Park DM, Akhtar MS, Ansari AZ, Landick R, Kiley PJ (2013). The bacterial response regulator ArcA uses a diverse binding site architecture to regulate carbon oxidation globally. *PLoS Genet*, 9(10):e1003839.
  94. Partridge JD, Browning DF, Xu M, Newnham LJ, Scott C, Roberts RE, Poole RK, Green J (2008). Characterization of the *Escherichia coli* K-12 *ydhYVWXUT* operon: regulation by Fnr, NarL and NarP. *Microbiology*, 154:608-618.
  95. Pier G, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998). *Salmonella* Typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature*, 393:79-82.
  96. Pilione MR, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, Harvill ET (2004). *pagP* is required for resistance to antibody-mediated complement lysis during *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection. *Infect Immun*, 72(5):2837-2842.
  97. Pronobis MI, Deutch N, Peifer M (2016). The Miraprep: A protocol that uses a miniprep kit and provides maxiprep yields. *PLoS One*, 11(8):e0160509.
  98. Prost L, Sanowar S, Miller S (2007). *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanism to promote survival within macrophages. *Immun Rev*, 219:55-65.
  99. Raetz CR, Whitfield C (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71:635-700.
  100. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007). Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 76:295-329.
  101. Raetz CR, Guan Z, Ingram BO, Six DA, Song F, Wang X, Zhao J (2009). Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res*, 50:103-108.
  102. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tukul C, Akcelik M, Baumler AJ (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun*, 74:19-27.
  103. Ravcheev DA, Gerasimova AV, Mironov AA, Gelfand MS (2007). Comparative genomic analysis of regulation of anaerobic respiration in ten genomes from three families of gamma-proteobacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*). *BMC Genomics*, 8:54.
  104. Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CR, Rick PD (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 4:495-503.
  105. Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CR, Trent MS (2006). An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* *lpxR* that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J Biol Chem*, 281:21974-21987.
  106. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahring U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8:217-225.
  107. Rivera-Chávez F, Bäumler AJ (2015). The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. *Annu Rev Microbiol*, 69:31-48.
  108. Robey M, O'Connell W, Cianciotto NP (2001). Identification of *Legionella pneumophila*

- rcp*, a *pagP*-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect Immun*, 69(7):4276-4286.
109. Rosenberger CM, Scott MG, Goid MR, Hancock RE, Finlay BB (2000). *Salmonella* Typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol*, 164:5894-5904.
  110. Roberts JA, Sockett PN (1994). The socio-economic impact of human *Salmonella enteritidis* infection. *Int J Food Microbiol*, 21:117-129.
  111. Rutten L, Mannie JP, Stead CM, Raetz CR, Reynolds CM, Bonvin AM, Tommassen JP, Egmond MR, Trent MS, Gros P (2009). Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:1960-1964.
  112. Rychlik I, Barrow PA (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev*, 29:1021-1040.
  113. Salmon KA, Hung SP, Steffen NR, Krupp R, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP (2005). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem*, 280(15):15084-15096.
  114. Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, Andrews-Polymeris HL, McClelland M (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *Plos Pathog*, 5:e1000477.
  115. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*, 3:1335-1344.
  116. Sawers G. 1999. The aerobic/anaerobic interface. *Curr Opin Microbiol*, 2:181-187.
  117. Schmieger H (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet*, 119(1):75-88.
  118. Schnaitman CA, Klena JD (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev*, 57:655-682.
  119. Sepulcre MP, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol*, 182(4):1836-1845.
  120. Shalel S, San K, Bennett G (2005). Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and Fnr regulation systems and metabolic responses. *Biotechnol Bioeng*, 89:556-564.
  121. Shprung T, Peleg A, Rosenfeld Y, Trieu-Cuot P, Shai Y (2012). Effect of PhoP-PhoQ activation by broad repertoire of antimicrobial peptides on bacterial resistance. *J Biol Chem*, 287:4544-4551.
  122. Silva CA, Blondel CJ, Quezada CP, Porwollik S, Andrews-Polymeris HL, Toro CS, Zaldívar M, Contreras I, McClelland M, Santiviago CA (2012). Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 80:839-849.
  123. Silva-Valenzuela CA, Velásquez F, Peñailillo J, Garcias-Papayani H, Fernández P, Tobar P, Contreras I, Santiviago CA, Álvarez SA (2016). O-antigen chain-length

- distribution in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is regulated by oxygen availability. *Biochem Biophys Res Commun*, 477:563-567.
124. Simpson BW, Trent MS (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol*, 17(7):403-416.
  125. Skovierova H, Rowley G, Rezuchova B, Homerova D, Lewis C, Roberts M, Kormanec J (2005). Identification of the  $\sigma^E$  regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 152(Pt 5):1347-1359.
  126. Soncini FC, Groisman EA (1996). Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol*, 178:6796-6801.
  127. Stone BJ, Garcia CM, Badger, JI, Hassett T, Smith RI, Miller VL (1992). Identification of novel *loci* affecting entry of *Salmonella* Enteritidis into eukaryotic cells. *J Bacteriol*, 174:3945-3952.
  128. Strandberg KL, Richards SM, Tamayo R, Reeves LT, Gunn JS (2012). An altered immune response, but not individual cationic antimicrobial peptides, is associated with the oral attenuation of Ara4N-deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. *PLoS One*, 7:e49588.
  129. Takeuchi O, Akira S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140:805-820.
  130. Tanamoto K, Azumi S (2000). *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. *J Immunol*, 164:3149-3156.
  131. Tobin DM, May RC, Wheeler RT (2012). Zebrafish: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*, 8:e1002349.
  132. Tran AX, Whittimore JD, Wyrick PB, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS (2006). The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J Bacteriol*, 188(12):4531-4541.
  133. Trede NS, Languenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI (2004). The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 20:367-379.
  134. Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI (2001a). A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 276:9083-9092.
  135. Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR (2001b). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem*, 276:43122-43131.
  136. Tsai CM, Frasch CE. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 119:115-119.
  137. van der Sar AM, Musters RJ, van Eeden FJ, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella* Typhimurium infections. *Cell Microbiol*, 5(9):601-611.
  138. Varas M, Fariña A, Díaz-Pascual F, Ortíz-Severín J, Marcoleta AE, Allende ML, Santiviago CA, Chávez FP (2017a). Live-cell imaging of *Salmonella* Typhimurium interaction with zebrafish larvae after injection and immersion delivery methods. *J Microbiol Methods*, 135:20-25.



139. Varas M, Ortiz-Severín J, Marcoleta AE, Díaz-Pascual F, Allende ML, Santiviago CA, Chávez FP (2017b). *Salmonella* Typhimurium induces cloacitis-like symptoms in zebrafish larvae. *Microb Pathog*, 107:317-320.
140. Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401:804-808.
141. Velásquez Felipe (2016). "Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre las modificaciones covalentes del lipopolisacárido de *Salmonella* Enteritidis: participación de los reguladores globales ArcA y Fnr". Memoria para optar al Título de Bioquímico, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.
142. Wang LC, Morgan LK, Godakumbura P, Kenney LJ, Anand GS (2012). The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. *EMBO J*, 31:2648-2659.
143. Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, Abraham SN, Raetz CR (2007). Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(10):4136-4141.
144. Wang X, Quinn PJ (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 49:97-107.
145. Whitfield C (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol*, 3:178-185.
146. Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR (2001). Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem*, 276:43111-43121.

## ANEXO 1

### Las regiones promotoras de genes involucrados en la síntesis y modificación el LPS en *S. Enteritidis* presentan sitios de unión hipotéticos para ArcA y Fnr

Al igual que en el caso de los promotores de *lpxO* y *pagP*, se empleo el *software* VirtualFootprinting para identificar ABS y FBS hipotéticos en los promotores de otros genes involucrados en la síntesis (*wbaB*, *wzy*, *waaL*, *wzz<sub>SE</sub>* y *wzz<sub>repE</sub>*) y modificación (*eptA*, *eptB*, y *lpxR*) del LPS. En el promotor del gen *waaL* que codifica la ligasa del AgO, se identificaron tres ABS hipotéticos; sin embargo, no se encontró una secuencia que pudiese representar un FBS. Todos los promotores restantes analizados presentan al menos tres ABS hipotéticos y al menos un posible FBS (**Figura 19**).

### A. *wbaB*, dTDP-glucosa-4,6-dehidratasa – biosíntesis del AgO

ATAGAGCAGCTTTTGCA TGAATAAGTA TTAACAACCGTGATAAATGGTTG GTGATAAACATAAT AACGGCAG  
TGAACATTGCAAGCGCAAGTTGGCTGAAGCGAGTGTGACTGCCGTTTTAGTTTTGTATAAAGGG CTTAAGTAA  
C AAGGGGTTATCTGGAGCATTTTAATGCTGATTTTATAAGATTAATCCTTGTTCGGATGCAATTAATAAGACA  
ATTAGCGTTTAAAGTTTTAGTGAGCTTTGCCCTGCTG EG CGAGGTTT GTAACA AGTCGATATGTACGCAGTGC  
ACTGGTAGCTGATGAGCCAGGGGCGGTAGCGTGTGTAACGACTTGAGCAATTAATTTTTATTGGCAAATTAATAC  
CACATTAATACGCCTT

### B. *wzy*, polimerasa del AgO

TAAACGCAGTAACAATCA TCGTAATTATCAA AAGCATTTACATTGCTTGATGTTTGTGCCGAAACGCCTGA  
TAGCTTCATGCTATCGGAGGCGCAGTAGATAGGAGT GTTAATGA GT GTTAAT AT GT CAATAACACGGTT  
TTGATATCGGGAAGATAGTATGAGTAATGATTATAGACTACCAGATTCAGAATATCTTGCCAGAAGATTTCCG  
TACCACACC TTGTTTGCCTGATG GCAATATTATTAATATTTTAATACTAAGCATTTTTTCTAAAGGCTCTAT

### C. *waaL*, ligasa del AgO

GCGATCCATATGCGGTATTTTTACATGCCACGACCCGCG ATGATAAACA CTGGCCGGAAGCAAACCTGGCGCGAG  
CTTATCGGTATGGTGGCAACACCGGATTACGGATAAACTTCCCTGGGGCGCGCTCATGAGGAGCCCCGGGCTA  
AACGACTGGCCGAAGCCTTTGACTATGTGGATG TGTACC GCG CATGAGCCTGGAGGAGTCCGACAGAGTGC  
GCTGGCGCAAATTTGTCGTATCGGTTGATACCGGCTGAGCCATCTCACC GCGCTCGACAGACCGAATATTA  
CGTATATGGCCCAACGGACCCTG GGTAAATTGG AGGTTATGGGAAGAACC AAATGGCATGCTGCTCACCAGAA  
AAAACTGGCGAATTTAGATGCCACAAGCGTATTTGGAAAGATTCATTAAGAGACTGTCTCATCCCAAACCT  
ATTGTGGAGAAAAG

### D. *wzz<sub>SE</sub>*, regulador de largo de cadena del AgO - moda larga

GGCATTATCGCCTGATTATGAAGAGTGGC TCCGATAACT TCCGCGCCTCATCGATTCAGGGG ATTATGAAGCG  
CATTAAAGCGAAAGGCGTAGAGTTCATCATCTATGAGCCGTAATGGAAGAAGATAC TTCCTTTAAC TCACGTC  
TTGAACGTGATTTGACTGCTTTAAACAGCAGGCGGATGTCATTATTTCCAACAGGATGGCGGC AGAGCTTTTGA  
T GTTGCTGAAA AAGTGTATACCCGCGATCTTTTCGGTAGTGATTAATAAGGCAATCGGGGCTGATGAGTCCCGA  
TGATTTATTGACCAATGAAAT AATGCTGATTTTT ATCATTAACTCTATGGCATATA TTGCTTTATGACT  
ACACTGTCTCCAGCTTCATCCTTTTTTTAGTTAGGGTATCT

### E. *wzz<sub>fepE</sub>*, regulador de largo de cadena del AgO - moda muy larga

ACATGCTACG CTCTTTGTGGCGGA TAAAACGGTGCCGGAAGGCGTATCGCCTGAACAGAGCTGGTCGCCGTGGA  
TAGCGTGGTTGGCTATTTATCGCCAGCCGTGCGCGCATGTAGATATTATTTCTCCCTCCGCTTTTGAAACTATCGG  
GCCATCATCAGCGAACTTATT AATAAATAAC GGGCGTT GTTCTGCCT TTAACAAATTAATCCTGAAAC  
CATAATAATTACTAATTATTATGGTTTTTTATTGCAACTATTAA TTCTTTAAC ATAAGTGATACATGCTACA  
GGCAAGTTTAAATCCGAATATTTAGCTTTTCGGGCACTGGCGCGTA AGATTGTTTCGGA FAATTCTGACTTGC  
TGTTAGAATCTCTGACAGGAATGTGTTCTTTTCATTGGATAAAGTTTTTCAGGTCATACGGC

#### F. *eptA*, fosfoetanolamina transferasa – Modificación del lípido A

AGCGGCGGCGCGACGGGCGTGCC **STTAAAAATT** AA **AACATCTGGTGGG** AGCAACAATAC CCCTCCAGTACC  
GACTCTACGCCTGTGCAACACACTGTCTGGTTTGTGTTGACGAACAAGCTGAACATATATCGCCAGCTATGTGCCT  
**GTTAAGCCGG** ATGCCACCGTTGGCACAGCGAATAAGC **DGGATGCCAC** CGTTGGCACAGCGAATGCGACGGTGA  
ATTTTAGCGTCACATACGAATAATCACTGAGGGCCAGTTC GCTGGCCCTTTTCCATTTTGTAGTATTTTGTAAA  
AATCTTCTCCGATCACACTCTCCGTTGCCACTTTCCCTCTGCT **GTGGTCTAC** TTAACCGTGCTTGTAGACTT  
TCTTACATCTGCGTTAGCCGCATATTTACCTGTTTGTATTACAGAATCGTTGTACAGGTCGTTTTTATCCCGATTCC  
CAGGGTTTGTGGC

#### G. *eptB*, fosfoetanolamina transferasa – Modificación del core

GTTATCTTACCCTGGTGCC **TTATCTTAC** ACCTGTGCCGCGCTGTTGTGTTAGGCCAC GGTCACCTTGGTA  
AAGCGCGCCCGCTGTATCTGCTGATTACCTTCGTCGCGTTTGTGTTATTGCATCTGGGCGGTCATCGGTTCCGGCGC  
CAAAGAAAGTGATGTGGTCGTTTCGTAC **GTTGATGGTGATCA** CCGCGCTGTATGCGTTGAATTACAACCGTATTC  
ACAAAAACCGTATCCGCTGGATGCGCCG **STTAAACAGG** ATTGA CCACGTGTA **GTTAATGTTA** TCGCAACAG  
GCCGATAGCGCAGGTTATCCGGCCGCCAACATTAAGTCTTAAGGTTCACTTAATTTACTTTGTACAGATT  
AGCGTCACCGAATCGATGGACGCATCAAC

#### H. *lpxR*, 3'-O-desacilasa – modificación del lípido A

ATTTTAGCAGATTA **ATGGTTTTATTAC** TTTTTCTTCTTAATAATAACTACCCTAATAATCAGATGGCAATA  
ATT **TGTTATATTA** CCCTACCAGCGTTAGATGCGCTCATCATTAAAGACAACACTATCACGGTAAAA **ATTAAT**  
**AAC** GATAAACATCGAAGACATCATAGAAAATGAGCTCAAAAAGAACACGTGATATTCATA **TGATACCAAA**  
**AAA** CATCGTATTATATGCATAATCGTGAAGCCAATAATTTCTCGCACTCAGATAGCGAATGAAAAATGGATATTC  
AATAATATCTGGCGC **GTG** **TTTTTTAACA** **C** CATTTTTCAACATTAAGGCAACGTATCCTCTCAATGACTCGCT  
GCTGGCAGGAGTTTAGTTATATTTAAAGATTCAATAAGCACTGCGCATCATGCGGCTGTGCTTATTACTTTGTAAA  
AATAAGAGTATTCACTTTCATATTCAGGGGTAAAAA

**Figura 19. La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en *S. Enteritidis* contiene ABS y FBS hipotéticos.** Secuencia nucleotídica del promotor de los genes *wbaB* (A), *wzy* (B), *waaL* (C), *wzz<sub>SE</sub>* (D), *wzz<sub>fepE</sub>* (E), *eptA* (F), *eptB* (G) y *lpxR* (H). Demarcados en cuadros rojos y azules se muestran los sitios de unión a ArcA y Fnr, respectivamente, predichos por el *software* VirtualFootprinting (Prodoric).

## ANEXO 2

### Construcción de mutantes regulatorias en los genes *lpxO* y *pagP* de *S. Enteritidis*

Para establecer el efecto de la regulación oxígeno-dependiente de *lpxO* y *pagP* sobre la producción de LPS y la virulencia de *S. Enteritidis*, se generaron mutantes regulatorias en estos genes, las cuales presentaban mutaciones puntuales en los ABS principalmente responsables de la interacción entre sus promotores y ArcA-P.

Como se mencionó en la **sección III.2.3**, se generó una mutante regulatoria de *S. Enteritidis* que presentaba mutaciones en la caja L-ABS1 en el promotor del gen *lpxO* (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_x-lpxO$ ) y otra que presentaba mutaciones en las cajas P-ABS2 y P-ABS3 en el promotor de *pagP* (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ ). Como se describió, esta estrategia (esquemática en la **Figura 4**) consistió en generar una mutante por delección de cada gen y luego proporcionar a la cepa mutante una copia nueva del gen con las mutaciones en sus promotores, la que se insertó en el genoma en un *locus* diferente al original. Para esto, se subclonó el gen en el plasmidio pWRK-Cam que contiene el gen que codifica la integrasa del fago Gifsy-1 que permite su inserción en el sitio *attG1*, localizado dentro del gen *lepA* en el cromosoma de *S. Enteritidis*. Como control, también se construyeron cepas a las que se les proporcionó una copia del gen con su promotor intacto (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT}-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT}-pagP$ ).

## **A2.1. Construcción de vectores pWRK que contienen alelos intactos o mutados de *lpxO* y *pagP***

### **A2.1.1. Generación de mutaciones puntuales en los promotores de *lpxO* y *pagP* mediante *overlap extension* PCR**

Para la introducción de mutaciones puntuales en los ABS seleccionados dentro de los promotores de *lpxO* y *pagP* se empleó *overlap extension* PCR. Se decidió reemplazar dos nucleótidos de las cajas ABS que corresponden a una guanina y una timina en la posición 2 y 3 de cada ABS, por una citosina y una adenina, respectivamente (**Figuras 20A y 21A**). Previamente se reportó que estos nucleótidos son cruciales para la unión de ArcA-P a los ABS en *E. coli* (Park *et al.*, 2013).

Para generar las mutaciones, se amplificaron diferentes regiones del promotor de estos genes y su correspondiente marco de lectura usando partidores que incluían las mutaciones deseadas (**Tabla 3**, nucleótidos en color rojo) y que además contenían regiones complementarias entre sí, tal como se esquematiza en la **Figura 5**. En el caso del gen *lpxO*, se amplificaron 2 regiones (ol-*lpxO*1 y ol-*lpxO*2, esquematizados en la **Figura 20B**) desde el DNA genómico de *S. Enteritidis*. Los fragmentos amplificados (**Figura 20C**, carriles 2 y 3) se ensamblaron mediante *overlap extension* PCR utilizando los partidores externos. A partir del ensamblaje de ambos fragmentos resultó un amplicón de 1590 pb, correspondiente a la región codificante del gen con el promotor mutado en L-ABS1 ( $P_X$ -*lpxO*, **Figura 20C**, carril 4). Como control, se amplificó mediante PCR convencional la región codificante de *lpxO* con su promotor intacto ( $P_{WT}$ -*lpxO*, **Figura 20C**, carril 5), usando en este caso los partidores externos y el DNA genómico de la cepa silvestre como molde.







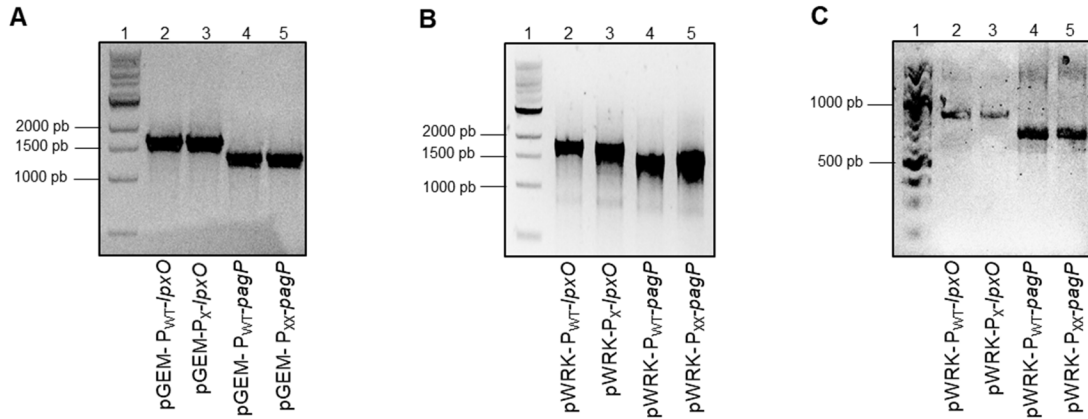
transformó *E. coli* DH5 $\alpha$  con los productos de la ligación y se corroboró la inserción de los fragmentos por PCR de colonias (**Figura 22A**). A partir de la amplificación del sitio de múltiple clonamiento de pGEM-T, se obtuvo un amplicón de 1700 pb en el caso de pGEM-P<sub>WT</sub>-*lpxO* y pGEM-P<sub>X</sub>-*lpxO* (**Figura 22A**, carriles 2 y 3), y de 1540 pb en el caso de pGEM-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pGEM-P<sub>XX</sub>-*pagP* (**Figura 22A**, carriles 4 y 5).

### **A2.1.3. Subclonamiento de los alelos silvestres o mutados de *lpxO* y *pagP* en pWRK-Cam**

Es importante recordar que los partidores más externos utilizados para la amplificación de estos genes presentaban sitios de corte para la enzima de restricción *Bam*HI. Estos sitios de corte permitieron la escisión de los alelos de *lpxO* y *pagP* desde pGEM-T y su posterior subclonamiento en el plasmidio pWRK-Cam, también digerido con esta enzima. Se transformó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$  *pir* con los productos de ligación y el subclonamiento de estos fragmentos se corroboró mediante PCR de colonias utilizando partidores que flanquean el sitio de clonamiento *Bam*HI en pWRK. Los amplicones obtenidos de la amplificación de pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO* y pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO* tenían un tamaño de 1790 pb (**Figura 22B**, carriles 2 y 3), y los amplificadores de pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* tenían un tamaño de 1630 pb (**Figura 22B**, carriles 4 y 5).

Además, fue necesario determinar la dirección en la que se insertaron los fragmentos, ya que se decidió utilizar plasmidios que contuvieran el alelo de *lpxO* o *pagP* en dirección contraria al promotor *lac* presente en pWRK-Cam, para evitar posibles efectos polares. Así, se realizó un PCR de colonias utilizando un partidore que hibrida en el plasmidio pWRK y otro que hibrida en cada fragmento. Los amplicones obtenidos de los plasmidios seleccionados tenían un tamaño de 824 pb en el caso de pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO* y pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO*

(Figura 22C, carriles 2 y 3), y un tamaño de 670 en el caso pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* (Figura 22C, carriles 4 y 5).



**Figura 22. Construcción de vectores derivados de pWRK-Cam que contienen alelos silvestres o mutados de los genes *lpxO* y *pagP* de *S. Enteritidis*.** **A)** Productos de PCR de colonias obtenidos de la amplificación de la región de múltiple clonamiento de pGEM-T Easy a partir de los plasmidios pGEM-P<sub>WT</sub>-*lpxO* (carril 2), pGEM-P<sub>X</sub>-*lpxO* (carril 3), pGEM-P<sub>WT</sub>-*pagP* (carril 4) y pGEM-P<sub>XX</sub>-*pagP* (carril 5). Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 kb. **B)** Productos de PCR de colonias obtenidos de la amplificación de la región que flanquea el sitio de clonamiento *Bam*HI en pWRK-Cam a partir de los plasmidios pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO* (carril 2), pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO* (carril 3), pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* (carril 4) y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* (carril 5). Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 kb. **C)** Productos de PCR de colonias obtenidos para corroborar la dirección de los insertos en los plasmidios pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO* (carril 2), pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO* (carril 3), pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP* (carril 4) y pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP* (carril 5). Carril 1: estándar de tamaño molecular 100 pb.

## A2.2. Reinserción en *cis* de los alelos silvestres y mutados de *lpxO* y *pagP* en mutantes $\Delta$ *lpxO* y $\Delta$ *pagP* de *S. Enteritidis*

### A2.2.1. Generación de mutantes $\Delta$ *lpxO* y $\Delta$ *pagP* de *S. Enteritidis* por reemplazo alélico

Las mutantes regulatorias (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *lpxO*/pWRK-P<sub>X</sub>-*lpxO* y *S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP*/pWRK-P<sub>XX</sub>-*pagP*), y sus contrapartes con el promotor intacto (*S. Enteritidis*  $\Delta$ *lpxO*/pWRK-P<sub>WT</sub>-*lpxO* y *S. Enteritidis*  $\Delta$ *pagP*/pWRK-P<sub>WT</sub>-*pagP*), se contruyeron sobre mutantes  $\Delta$ *lpxO* y  $\Delta$ *pagP* de *S. Enteritidis*. De esta manera, las cepas generadas sólo tenían

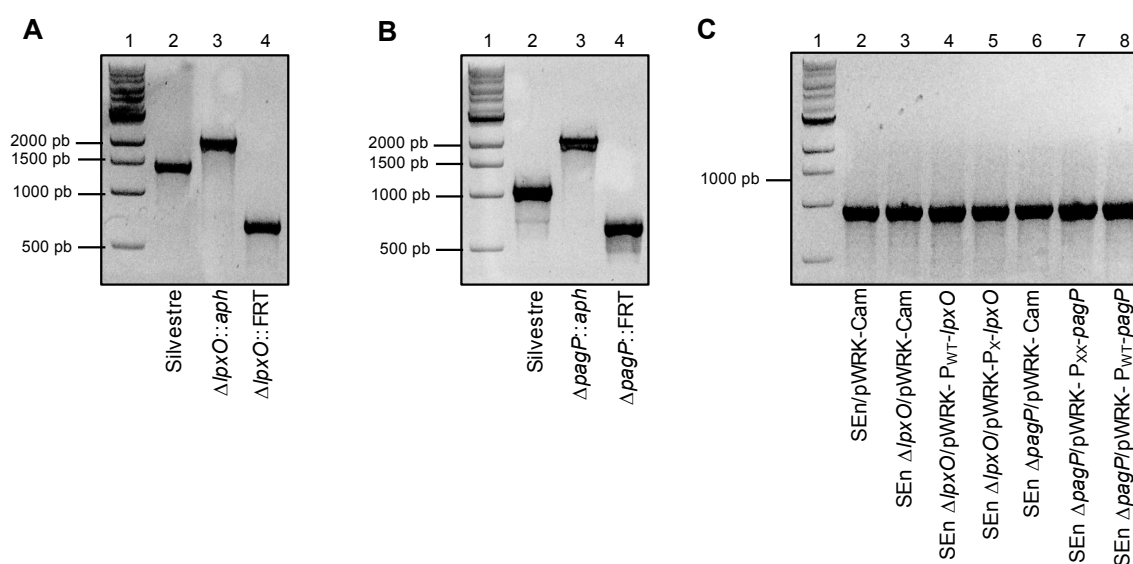
una copia del gen correspondiente, la cual estaba contenida dentro de los plasmidios derivados de pWRK-Cam insertos en el *locus attG1* en el cromosoma bacteriano.

La delección de los genes *lpxO* y *pagP* se llevó a cabo mediante reemplazo alélico como se detalla en la **sección II.9**. El genotipo de las mutantes se corroboró mediante PCR de colonias utilizando partidores que hibridan en la región adyacente a los genes en cuestión (**Figura 23**). En la amplificación del gen *lpxO* silvestre se obtuvo un amplicón de 1460 pb (**Figura 23A**, carril 2), mientras que en la amplificación de los alelos mutantes  $\Delta lpxO::Kan$  y  $\Delta lpxO::FRT$  se obtuvo un amplicón de ~2090 pb y 600 pb, respectivamente (**Figura 23A**, carriles 3 y 4). Para el caso de *pagP*, a partir de la amplificación del alelo silvestre se obtuvo un amplicón de 1150 pb (**Figura 23B**, carril 2), mientras que de la amplificación de los alelos mutantes  $\Delta pagP::Kan$  y  $\Delta pagP::FRT$  se obtuvo un amplicón de ~2090 pb y 600 pb, respectivamente (**Figura 23B**, carriles 3 y 4).

#### **A2.2.2. Inserción cromosomal de los plasmidios pWRK en las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de *S. Enteritidis***

Finalmente, se transformaron las cepas *S. Enteritidis*  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$  con los plasmidios derivados de pWRK-Cam que contenían los genes *lpxO* y *pagP* con mutaciones en los ABS presentes en sus promotores (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$ ). Como control para ensayos posteriores de esta tesis, se transformó con el plasmidio pWRK-Cam vacío la cepa silvestre (*S. Enteritidis/pWRK-Cam*), y las mutantes  $\Delta lpxO$  (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-Cam$ ) y  $\Delta pagP$  (*S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-Cam$ ) de *S. Enteritidis*. Además, también se transformaron las mutantes  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$  de *S. Enteritidis* con los plasmidios pWRK que contenían un alelo intacto de cada gen (*S. Enteritidis*  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT-lpxO}$  y *S. Enteritidis*  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$ ).

La inserción cromosomal de los plasmidios fue corroborada por PCR de colonias utilizando un partidor que hibrida en el gen *lepA*, adyacente al sitio *attG1* donde se inserta pWRK, y un partidor que hibrida en pWRK. El amplicón obtenido en la amplificación de esta región en todos los casos fue de 985 pb (**Figura 23C**). La presencia de las mutaciones introducidas en L-ABS1 del promotor de *lpxO* y en P-ABS2 y P-ABS3 del promotor de *pagP*, se corroboraron mediante secuenciación.



**Figura 23. Reinserción en *cis* de alelos silvestres y mutados de *lpxO* y *pagP* en mutantes  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$  de *S. Enteritidis*.** **A)** Productos de PCR de colonias obtenidos de la amplificación del gen *lpxO* desde las cepas silvestre (carril 2), las mutantes  $\Delta lpxO::Kan$  (carril 3) y  $\Delta lpxO::FRT$  (carril 4) de *S. Enteritidis*. Carril 1: estándar de tamaño molecular 1 kb. **B)** Productos de PCR de obtenidos de la amplificación del gen *pagP* desde la cepa silvestre (carril 2) y las mutantes  $\Delta pagP::Kan$  (carril 3) y  $\Delta pagP::FRT$  (carril 4). Carril 1: estándar de tamaño molecular 1 kb. **C)** Productos de PCR de colonias obtenidos de la amplificación de la región contenida entre el gen *lepA* y el plasmidio pWRK-Cam (o sus derivados) insertos en el *locus attG1* desde la cepa *S. Enteritidis/pWRK-Cam* (carril 2), *S. Enteritidis  $\Delta lpxO/pWRK-Cam$*  (carril 3), *S. Enteritidis  $\Delta lpxO/pWRK-P_{WT-lpxO}$*  (carril 4), *S. Enteritidis  $\Delta lpxO/pWRK-P_X-lpxO$*  (carril 5), *S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-Cam$*  (carril 6), *S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-P_{WT-pagP}$*  (carril 7) y *S. Enteritidis  $\Delta pagP/pWRK-P_{XX-pagP}$*  (carril 8). Carril 1: estándar de tamaño molecular 1 kb.

