



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Programa de Magíster en Bioquímica

**“Caracterización de la isla genómica IG-*asnT*
de *Salmonella enterica* y su papel en la interacción
del serovar Enteritidis con macrófagos murinos”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica,
Mención Proteínas Recombinantes y Biotecnología**

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

CAROLINA PAZ QUEZADA BUSTOS

Directores: Lucía Inés Contreras Osorio
 Carlos Alberto Santiviago Cid

SANTIAGO, CHILE
OCTUBRE 2009

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Anillo ADI-08/2006.

Dedicada a mi familia y amigos,
quienes construyen conmigo mi realidad y felicidad diaria.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Bernardo y María Teresa, por toda su confianza y apoyo. Por creer en mí desde un principio, en mi proyecto de vida, en mis capacidades. Siempre tuve un soporte para llevar a cabo mis sueños y eso lo valoro infinitamente. Los amo.

A toda mi familia: mis abuelos, tíos, primos y hermanos; por estar ahí para apoyarme y regalarme en todo momento, por hacer de mi existencia una celebración constante.

A mis sobrinos, por llenarme la vida de felicidad.

A las personas que han sido mi pilar en Santiago. A Juan Pablo y Claudia por ser las personas más maravillosas del mundo, apenas cabe en mi corazón el amor que les tengo. A Roberto y su familia por su inmenso cariño. También a Ricardo y su familia. A mis amigos del alma (Berni, Fran, Roberto, Felipe, Iris, Loren, Juan) porque junto a ellos mi felicidad no tiene límites. A mis compañeros de universidad por todas las cosas buenas que me entregaron. A David, quien es digno de toda mi admiración y ha sido increíble conmigo. A los amigos de ayer y hoy, mis más sinceros agradecimientos por ser parte de mi vida.

Agradezco a la Universidad de Chile y a sus profesores por la educación que me entregaron. Especialmente, a las personas que integran el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, por su contribución siempre positiva al desarrollo de mi tesis. A la doctora Inés Contreras por abrirme las puertas de su laboratorio, por demostrarme siempre cariño y confianza. A Carlos Santiviago por convertirse en un tutor amigo. A la profesora Mercedes, Sergio, Anilei, Denisse, Javier, Mara, Cecilia, Juan, Vero, Paula, Alicia, por toda su ayuda y los buenos momentos compartidos. Particularmente a Carlos Blondel, que desde un principio tuvo una disposición increíble a enseñarme. Por supuesto, a la doctora Cecilia Toro, por permitirme ocupar un lugar en su Laboratorio, y a toda la gente del Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina que facilitó mi trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epidemiología de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	1
1.2. Transmisión zoonótica	2
1.3. Estrategias de control de <i>S. Enteritidis</i>	2
1.4. Mecanismos moleculares de patogenicidad de <i>Salmonella</i> : Islas genómicas..	3
1.5. Isla IG- <i>asnT</i> en <i>S. Enteritidis</i>	5
1.6. Papel de la isla IG- <i>asnT</i> de <i>S. Enteritidis</i> en virulencia	8
1.7. Hipótesis	9
1.8. Objetivo General	9
1.9. Objetivos Específicos.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Reactivos	10
2.2. Cepas Bacterianas.....	12
2.3. Plasmidios.....	13
2.4. Partidores.....	13
2.5. Medios de cultivo	15
2.5.1. Cultivo bacteriano	15
2.5.2. Cultivo celular.....	15
2.6. Generación de mutantes en los marcos de lectura seleccionados de la isla IG- <i>asnT</i>	16
2.6.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis	16

2.6.2.	Mutagénesis.....	17
2.6.3.	Comprobación de la mutagénesis.....	18
2.6.4.	Electroforesis en geles de agarosa.....	19
2.7.	Construcción de las cepas de <i>S. Enteritidis</i> PT4 con la fusión cromosomal <i>tIpA3xFlag</i>	19
2.7.1.	Incorporación del epítotope 3xFlag en el extremo C terminal de la proteína TIpA en <i>S. Enteritidis</i> PT4	19
2.7.2.	Comprobación de la correcta construcción de la cepa <i>tIpA3xFlag</i>	20
2.7.3.	Transducción de las mutaciones en las regiones o genes de la isla IG- <i>asnT</i> a la cepa <i>tIpA3xFlag</i>	21
2.7.3.1.	Preparación de los lisados de Fago de las cepas dadoras.....	22
2.7.3.2.	Transducción.....	22
2.7.3.3.	“Cross streaking”	23
2.8.	Inducción de la expresión del gen <i>tIpA</i> a partir de un vector inducible por ramnosa (pTIpA3xFlag).....	23
2.8.1.	Construcción del plasmidio pTIpA3xFlag	23
2.8.1.1.	Digestión y desfosforilación del plasmidio pSC rhaB2	23
2.8.1.2.	Amplificación de la fusión <i>tIpA3xFlag</i> cromosomal para clonar en el vector ..	24
2.8.1.3.	Digestión del amplicón <i>tIpA3xFlag</i>	25
2.8.1.4.	Ligación del amplicón <i>tIpA3xFlag</i> al vector pSC rhaB2	25
2.8.2.	Construcción de las cepas PT4 pTIpA3xFlag, PT4 pTIpA3xFlag Δ SEN1976- 1999 y PT4 <i>cat3xFlag</i> pTIpA3xFlag	25
2.8.3.	Inducción de la expresión de <i>tIpA3xFlag</i> desde el plasmidio inducible por ramnosa (pTIpA3xFlag).....	26
2.9.	Producción y secreción de la proteína TIpA3xFlag	26
2.9.1.	Obtención de proteínas de extractos bacterianos totales	26
2.9.2.	Separación de las fracciones citosólicas y de membrana de los lisados bacterianos.....	27
2.9.3.	Obtención de proteínas de sobrenadantes de medios de cultivo	27
2.9.4.	Cuantificación de proteínas.....	28
2.9.5.	Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
2.9.6.	Electrotransferencia e inmunoblot.....	28

2.10.	Cuantificación de la actividad del promotor del gen <i>tIpA</i> en cepas de <i>S. Enteritidis</i> PT4.....	29
2.10.1.	Construcción de las cepas con fusión transcripcional PT4 <i>tIpA-lacZ</i>	29
2.10.2	Medición de la actividad β -galactosidasa.....	30
2.11.	Ensayos de infección <i>in vitro</i> usando macrófagos murinos J774	31
2.11.1.	Ensayos de supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Enteritidis</i> PT4 en macrófagos	31
2.11.2.	Análisis Estadístico	32
2.11.3.	Ensayo de viabilidad celular de macrófagos infectados con cepas de <i>S. Enteritidis</i>	32
2.11.4.	Análisis de la producción y exportación de TIpA en macrófagos.....	33
3.	RESULTADOS.....	34
3.1.	Obtención de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> con deleciones definidas de marcos de lectura o regiones de la isla IG- <i>asnT</i>	34
3.2.	Mutantes de <i>S. Enteritidis</i> PT4 con deleciones definidas en marcos de lectura de la isla IG- <i>asnT</i> presentan una supervivencia intracelular disminuida en macrófagos murinos J774.....	36
3.3.	TIpA participa en la inducción de muerte celular en macrófagos murinos J774 infectados con <i>S. Enteritidis</i> PT4	40
3.4.	La proteína TIpA se produce en cultivos de <i>S. Enteritidis</i> PT4 <i>in vitro</i>	41
3.5.	Los genes codificados en la isla IG- <i>asnT</i> no participan en la producción de la proteína TIpA de <i>S. Enteritidis</i> PT4.....	43
3.6.	Los genes codificados en la isla IG- <i>asnT</i> no participan en la regulación de la expresión del gen <i>tIpA</i> en <i>S. Enteritidis</i> PT4.....	47
3.7.	La proteína TIpA no es secretada al medio extracelular en cultivos estándar <i>in vitro</i>	48
3.8.	La proteína TIpA se expresa al interior de bacterias recuperadas desde macrófagos J774 infectados	50
4.	DISCUSIÓN	55

5.	CONCLUSIONES	63
6.	BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis	12
Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente Tesis	13
Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Isla Genómica IG- <i>asnT</i> en <i>Salmonella</i> Enteritidis	5
Figura 2.	Marcos de lectura y regiones pertenecientes a la isla IG- <i>asnT</i> seleccionadas para mutagénesis.....	34
Figura 3.	Esquema del reemplazo alélico que permite generar mutantes por delección de los genes de interés en el cromosoma de cepas de <i>Salmonella</i>	35
Figura 4.	PCR de comprobación del reemplazo alélico producido en cada cepa construida.....	36
Figura 5.	Esquema del ensayo de supervivencia intracelular in vitro de <i>S.</i> Enteritidis PT4 en macrófagos de origen murino J774	37
Figura 6.	Curvas de supervivencia intracelular de cepas de <i>S. Enteritidis</i> al interior de macrófagos J774.....	38
Figura 7.	Porcentajes de internalización de cepas de <i>S. Enteritidis</i> al interior de macrófagos J774.....	38
Figura 8.	Porcentajes de supervivencia intracelular de cepas mutantes de <i>S.</i> Enteritidis con delecciones de genes o regiones de la isla IG- <i>asnT</i> en comparación a la cepa silvestre.....	39
Figura 9.	Ensayo de inducción de muerte de macrófagos infectados con cepas de <i>S. Enteritidis</i> PT4	40
Figura 10.	Productos de PCR obtenidos de los clones positivos para la fusión cromosomal <i>tlpA3xFlag</i>	41
Figura 11.	Representación esquemática de la secuencia primaria de la proteína TlpA.....	42
Figura 12.	Análisis de la producción <i>in vitro</i> de la proteína TlpA3xFlag de <i>S.</i> Enteritidis en CL y medio mínimo N.....	43
Figura 13.	Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag en cepas de <i>S.</i> Enteritidis crecidas en caldo Luria	44
Figura 14.	Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag en cepas de <i>S.</i> Enteritidis crecidas en medio mínimo N.....	45

Figura 15.	Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag de <i>S. Enteritidis</i> en ausencia de los genes de interés de la isla IG- <i>asnT</i>	46
Figura 16.	Cuantificación de la actividad β -galactosidasa de las cepas con fusión <i>tlpA-lacZ</i> en presencia y ausencia de los genes de interés de la isla IG- <i>asnT</i>	47
Figura 17.	Análisis de la producción y secreción de la proteína TlpA3xFlag expresada a partir de un plasmidio inducible por ramnosa.....	49
Figura 18.	Curva de inducción de TlpA3xFlag con concentraciones crecientes de ramnosa (0,001%- 0,1%) en la cepa que expresa la proteína CAT3xFlag como control interno y transformada con el plasmidio pTlpA3xFlag.....	51
Figura 19.	Análisis de la producción y secreción <i>in vitro</i> de la proteína TlpA3xFlag de <i>S. Enteritidis</i> en macrófagos	52
Figura 20.	Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag de <i>S. Enteritidis</i> en bacterias internalizadas en macrófagos murinos <i>in vitro</i>	54

RESUMEN

Salmonella Enteritidis es actualmente el serovar de *Salmonella* más prevalente a nivel mundial. Mediante el análisis bioinformático de los genomas de distintos serovares de *Salmonella* identificamos una región genómica que se encuentra presente en *S. Enteritidis*, así como en *S. Gallinarum* y *S. Dublin* (serovares filogenéticamente cercanos a *S. Enteritidis*). Esta región corresponde a una Isla de Patogenicidad, la cual denominamos IG-*asnT*. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que varias de las proteínas codificadas en IG-*asnT* de *S. Enteritidis* participarían en la colonización de órganos internos de ratón en un modelo de virulencia *in vivo*. Entre ellas se encuentran proteínas estructurales de un pilus tipo IV (*SEN1977*), una proteína involucrada en movilización de plasmidios (*SEN1980*) y TlpA (*TIR-like protein A*), la cual presenta un dominio con homología a proteínas que participan en respuestas inflamatorias de células del sistema inmune. Debido a que la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en los macrófagos de su hospedero es un factor indispensable para su diseminación sistémica y la posterior colonización de órganos blanco, en este proyecto nos propusimos determinar si la isla IG-*asnT* codifica productos génicos que cumplen un papel en la interacción de *S. Enteritidis* con macrófagos murinos y definir si al menos uno de ellos participa en la producción y/o secreción de la proteína TlpA. Para esto, se estudió la capacidad de varias mutantes de genes presentes en IG-*asnT* para sobrevivir al interior de macrófagos murinos, de las cuales las mutantes *SEN1977*, *SEN1980* y *tlpA* presentaron una capacidad disminuida de supervivencia en estos macrófagos en comparación a la cepa silvestre. Por otra parte, nuestros resultados indican que *tlpA* participa en el proceso que lleva a la muerte celular de los macrófagos infectados con *S. Enteritidis*. Pudimos determinar que TlpA se produce en distintas condiciones de cultivo *in vitro*, además de expresarse al interior de los macrófagos infectados. El resto de los genes presentes en la isla no participan en la expresión ni en la producción de la proteína TlpA en las condiciones estudiadas. Estos resultados entregan nueva evidencia sobre factores de virulencia de *S. Enteritidis* involucrados en su adaptación a células hospederas, que podrían explicar en parte su prevalencia sobre otros serovares.

SUMMARY

Salmonella Enteritidis is currently the most prevalent *Salmonella* serovar worldwide. By a bioinformatic analysis of different *Salmonella* serovars genomes we identified a genomic region present in *S. Enteritidis*, and also in *S. Gallinarum* and *S. Dublin*, both of which are phylogenetically related to *S. Enteritidis*. This region corresponds to a Pathogenicity island, and we named it GI-*asnT*. Preliminary results obtained in our laboratory suggest that several proteins encoded in the *S. Enteritidis* GI-*asnT* Island are involved in colonization of internal organs, in an *in vivo* murine model of virulence. Among them we can find structural proteins of a type IV pilus (*SEN1977*), a protein involved in plasmid mobilization (*SEN1980*) and TlpA (*TIR-like protein A*), containing a TIR domain present in proteins that participate in the inflammatory responses produced by cells in the immune system. Given that *Salmonella*'s ability to survive inside its host macrophages is essential to produce a systemic spread and internal organs colonization, in this project we aimed to identify gene products encoded in GI-*asnT* that participate in the interaction between *S. Enteritidis* and murine macrophages and to define if at least one of them is involved in the production and/or secretion of TlpA. To carry out this aim, we studied the ability of several mutants of GI-*asnT* genes to survive inside murine macrophages. Single mutants in genes *SEN1977*, *SEN1980* and *tlpA* showed a diminished intracellular survival in these macrophages as compared to the *wild type* strain. On the other hand, our results indicate that *tlpA* is implicated in the process that culminates with the death of the macrophages infected with *S. Enteritidis*. We demonstrated that TlpA is produced under different culture conditions *in vitro*, including the production of the protein inside the infected macrophages. Other genes in IG-*asnT* do not participate in the expression or production of TlpA under the studied conditions. These results bring new evidence about virulence factors involved in the adaptation of *S. Enteritidis* to host cells that could explain its prevalence over other serovars.

ABREVIATURAS

AL	Agar Luria
Amp	Ampicilina
°C	Grados Celsius
C	Concentración
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CL	Caldo Luria
Cm	Cloranfenicol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
h	Hora
IG	Isla Genómica
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
Kan	Kanamicina
L	Litros
min	Minutos
MOI	Multiplicidad de infección
OD	Densidad óptica
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS	Dodecilsulfato de amonio
s	Segundos
SFB	Suero fetal bovino
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
TCA	Ácido tricloro acético
TBS	Amortiguador Tris salino
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Volts

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, que en conjunto agrupan a los más de 2400 serovares determinados serológicamente [Brenner y cols., 2000]. Dependiendo del serovar en cuestión, *Salmonella* puede tener un espectro amplio o limitado de hospederos que incluye insectos, reptiles, aves y mamíferos. Los serovares que causan enfermedades en animales de sangre caliente, entre ellos el hombre, pertenecen principalmente a *Salmonella enterica*.

Las infecciones causadas por *Salmonella* en seres humanos y animales constituyen un problema global de salud pública y un riesgo importante para la producción animal, con una incidencia que se ha incrementado mundialmente durante los últimos 25 años [Vicente y cols., 2007]. Actualmente, el principal agente etiológico causante de salmonelosis en seres humanos es *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), siendo el serovar aislado con mayor frecuencia en Europa y América [Guard-Petter y cols., 2001; Uribe y cols., 2006]. En Chile, la epidemia causada por *S. Enteritidis* comenzó en 1994 y actualmente representa sobre el 70% de los aislados clínicos de *Salmonella* [Fica y cols., 2001; Fernández y cols., 2003]. Este serovar se transmite desde aves de corral al hombre a través del consumo de productos avícolas contaminados [Guard-Petter y cols., 2001]. El aumento progresivo de infecciones por *S. Enteritidis* en humanos se explicaría entonces por el consumo de huevos y carnes de ave contaminados con este serovar. *S. Enteritidis* PT4 es el fagotipo predominante entre los aislados clínicos y avícolas a nivel mundial y también en Chile [Guard-Petter y cols., 2001; Fica y cols., 2001; Fernández y cols., 2003].

1.2. Transmisión zoonótica

S. Enteritidis es capaz de infectar una gran variedad de hospederos, que incluye roedores, aves de corral y al hombre [Guard-Petter y cols., 2001]. El ciclo infeccioso de este patógeno comienza con la contaminación de gallineros a través de vectores como roedores y aguas residuales contaminadas. La bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el corral, infectando por vía oral a las gallinas. Tanto en aves como roedores, *S. Enteritidis* coloniza e invade el epitelio intestinal, para luego diseminarse sistémicamente y colonizar órganos internos, principalmente el bazo y el hígado. En las aves, también es capaz de colonizar los oviductos, contaminando los huevos previa formación de la cáscara (transmisión vertical). Alternativamente, los huevos pueden contaminarse a través de las heces fecales de la gallina (transferencia horizontal).

La gallina adulta infectada por *S. Enteritidis* no presenta síntomas de enfermedad, por lo que es difícil determinar a tiempo cuándo los huevos producidos en un gallinero están contaminados [Guard-Petter y cols., 2001]. Debido a esto, los huevos pueden haber sido destinados para consumo humano, infectando a las personas que los ingieren. Las manifestaciones clínicas de la salmonelosis en el ser humano incluyen principalmente diarrea, náusea, fiebre y dolor abdominal. El periodo de incubación de la bacteria no supera los tres días y la enfermedad tiene una duración autolimitada cercano a una semana. Sin embargo, la severidad de la enfermedad puede ser distinta cuando se trata de niños, ancianos e inmunocomprometidos, generándose cuadros sistémicos que pueden causar la muerte del individuo.

1.3. Estrategias de control de *S. Enteritidis*

La transmisión horizontal del patógeno se puede prevenir fácilmente aplicando medidas preventivas de limpieza y desinfección en el gallinero y en los huevos [Guard-Petter y cols., 2001]. En cambio, la transmisión vertical es más difícil de combatir pues para esto se requiere la eliminación del patógeno del reservorio aviar, o al menos evitar la colonización del intestino de las aves durante la infección. Este problema se ha

abordado principalmente mediante el desarrollo de vacunas para aves de postura empleando mutantes atenuadas vivas o bacterias muertas por agentes químicos o físicos. Mediante el uso de mutantes atenuadas vivas se ha logrado inducir una respuesta inmune celular capaz de reducir la colonización intestinal y de órganos internos, con variaciones en los tiempos que perdura esta respuesta [Cerquetti y cols., 2000; Babu y cols., 2004; Betancor y cols., 2005]. Por otra parte, utilizando bacterias muertas se ha logrado una mayor respuesta inmune humoral, pero no una disminución en la liberación de la bacteria en las heces.

Debido a la constante aparición de cepas resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados y a la necesidad de desarrollar estrategias de control seguras y eficaces contra *S. Enteritidis*, resulta indispensable entender los mecanismos moleculares que le permiten llevar a cabo su ciclo infeccioso. Este conocimiento permitirá desarrollar nuevas y mejores vacunas o nuevos tratamientos que permitan abordar eficientemente el problema.

1.4. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella*: Islas genómicas

Los mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella enterica* involucran una gran cantidad de genes, generalmente agrupados en regiones denominadas islas genómicas (IGs). Una IG se puede identificar por presentar un contenido G+C distinto al promedio del genoma, estar flanqueada por secuencias directas repetidas de tamaño variable, encontrarse insertas en genes que codifican tRNAs o sRNAs en el genoma, contener genes asociados a elementos genéticos móviles como bacteriófagos y transposones y contener genes adicionales que confieren ventajas adaptativas en determinadas condiciones o ambientes [Hacker y cols., 2001]. Las IGs serían adquiridas por transferencia horizontal y pueden contribuir directamente a la virulencia del patógeno (Islas de Patogenicidad) u otorgar nuevas características que permitan cursar un ciclo infeccioso exitoso, lo que explica la estabilidad de estos elementos genéticos una vez adquiridos.

Un análisis comparativo de genomas completos permitió establecer que alrededor del 80% de los genes presentes en distintos serovares de *Salmonella enterica* son homólogos entre sí, siendo el 20% restante de cada genoma único de cada serovar [Bäumler y cols., 1998; Wain y cols., 2001]. Dentro de las secuencias conservadas se encuentran las IGs que participan en mecanismos generales de infección, mientras que en las secuencias únicas de cada serovar se encontrarían los genes que dan cuenta de la diferencia entre los distintos serovares en su especificidad de hospedero y virulencia.

Se cree que los mecanismos moleculares utilizados por *S. Enteritidis* para infectar y colonizar roedores y aves de postura se asemejan a los que utiliza *S. Typhimurium* en ratones. Es importante destacar que el modelo *S. Typhimurium*-ratón es el más usado para estudios de patogenicidad en *Salmonella enterica*. En este modelo, se ha descrito la participación de cinco islas de patogenicidad, denominadas *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPIs) [Wain y cols., 2001]. SPI-1 codifica proteínas que permiten la invasión de las células epiteliales del intestino una vez que la bacteria alcanza esta porción del tracto digestivo. Estas proteínas conforman un sistema de secreción tipo III (SSTT), que inyecta proteínas efectoras al citoplasma de la célula epitelial, produciendo un reordenamiento del citoesqueleto que promueve la internalización de la bacteria [Galán y cols., 1999]. Una vez dentro de la célula, la bacteria crece y se multiplica para luego abandonar el epitelio intestinal y entrar en contacto con los macrófagos. SPI-2 codifica un segundo SSTT que es necesario para la supervivencia de la bacteria al interior de las células fagocíticas [Wain y cols., 2001]. SPI-3 contiene genes que codifican proteínas esenciales para el crecimiento intracelular en condiciones limitantes de magnesio [Blanc-Potard y cols., 1997]. SPI-4 codifica para un sistema de secreción de tipo I junto a su proteína efectora [Wong y cols., 1998], participando en la colonización intestinal en bovinos y ratones [Kiss y cols., 2007]. Finalmente, SPI-5 codifica proteínas necesarias para el desarrollo de enterocolitis, pero que no son requeridas para la infección sistémica del hospedero [Wood y cols., 1998].

1.5. Isla IG-*asnT* en *S. Enteritidis*

Con el fin de identificar islas genómicas presentes en *S. Enteritidis* que nos permitieran entender sus mecanismos particulares de patogenicidad, analizamos un estudio previo en el cual se compararon las secuencias genómicas completas de representantes de 16 serovares de *Salmonella enterica*. Mediante este estudio, se identificaron islas genómicas compartidas por distintos serovares de *Salmonella* y también islas específicas del serovar Enteritidis [Porwollik y cols., 2005].

Nuestro análisis reveló que una de las islas genómicas definidas en *S. Enteritidis* se encuentra inserta en el gen *asnT*, que codifica el tRNA-*asnT*. Esta isla, a la que denominamos IG-*asnT*, fue recientemente descrita en un análisis genómico comparativo como una de las regiones de variabilidad que diferencia los genomas de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Typhimurium* [Thomson y cols., 2008]. En la cepa secuenciada de *S. Enteritidis* PT4, la isla IG-*asnT* tiene un tamaño de ~26,5 kb y comprende treinta marcos de lectura que en su mayoría codifican proteínas hipotéticas. Cabe destacar que algunos marcos de lectura presentan homología con proteínas descritas en la literatura (**Figura 1**).

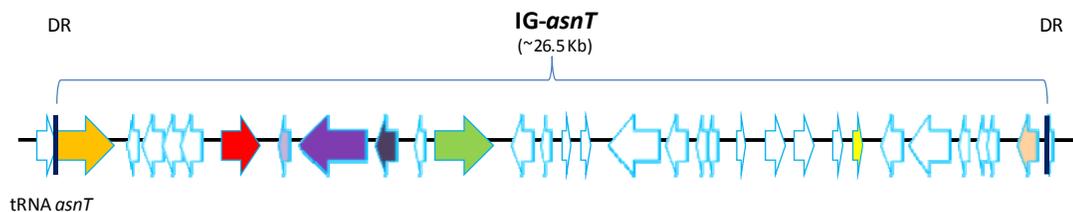


Figura 1. **Isla genómica IG-*asnT* en *Salmonella* Enteritidis.** En colores se muestran los genes que codifican para proteínas con secuencias homólogas a proteínas descritas.

- SEN 1970, integrasa.
- SEN 1975, TlpA. Secuencias con homología a dominios TIR.
- SEN 1976, proteína Pil V hipotética.
- SEN 1977, pilina tipo IV hipotética.
- SEN 1978, pilina tipo IV hipotética.
- SEN 1980, dominios MobA/MobL (transferencia plasmidial).
- SEN 1993, regulador transcripcional H-NS.
- SEN 1998, regulador transcripcional AlpA.

Una copia completa de la isla IG-*asnT* también está presente en el genoma de las cepas secuenciadas de *S. Gallinarum* y *S. Dublin*. Estos serovares son filogenéticamente cercanos a *S. Enteritidis* [McClelland y cols., 2004], compartiendo con ellos un entorno común en ambientes agro-ganaderos.

Una de las proteínas codificadas en IG-*asnT* fue identificada al realizar una búsqueda de proteínas bacterianas con homología a componentes del sistema inmune innato [Newman y cols., 2006]. Esta proteína fue denominada TlpA (*TIR-like protein A*), por poseer una secuencia con homología a dominios Toll/IL-1R (TIR). Estos dominios TIR se encuentran presentes en proteínas eucariontes que participan en la transducción de señales que se activan en respuesta a citoquinas proinflamatorias y a la presencia de moléculas derivadas de patógenos, como el lipopolisacárido de bacterias Gram-negativo. Como consecuencia de esta cascada de señales, se produce la activación de NFκB, un regulador transcripcional central en la respuesta inflamatoria. Clonando la secuencia del gen *tlpA* de *S. Enteritidis* en un vector de expresión y transfectándolo en células HEK (*human embryonic kidney cells*), se pudo observar que TlpA es capaz de inhibir la activación de NFκB tras estimular las células con IL-1β. El receptor para esta citoquina presenta un dominio citosólico TIR. Por otra parte, una cepa de *S. Enteritidis* mutante en el gen *tlpA* resultó atenuada en un modelo murino de virulencia *in vivo*, además de presentar una menor capacidad de sobrevivir al interior de macrófagos humanos THP-1 *in vitro*. Estas evidencias sugieren que TlpA es capaz de interrumpir señales celulares mediadas por dominios TIR, interfiriendo con la respuesta inflamatoria del hospedero. Por otra parte, TlpA también mostró la capacidad de inducir la secreción de IL-1β por mecanismos que involucran la activación de la caspasa-1. El papel que juega TlpA en esta inducción es desconocido, quedando abierta la posibilidad de que TlpA participe en mecanismos pro-apoptóticos.

A diferencia de *tlpA*, no existen reportes en la literatura sobre los otros genes presentes en la isla IG-*asnT*. Analizando la secuencia de esta isla en *S. Enteritidis* PT4 se identificaron tres marcos de lectura con homología a genes que codifican proteínas estructurales de un pilus tipo IV. Los pili tipo IV son organelos filamentosos que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en procesos como movilidad,

adhesión, secreción y transducción de señales, entre otros [Craig y cols., 2008]. Notablemente, los genes que codifican estas proteínas no comparten homología con los que codifican la pilina del pilus tipo IV de *Salmonella* Typhi [Zhang y cols., 2000]. De esta forma, el pilus codificado en *S. Enteritidis* sería distinto al descrito en *S. Typhi*. Por otra parte, es posible que genes presentes en la isla IG-*asnT* codifiquen proteínas que cumplan alguna función en el ensamblaje del pilus o que sean secretadas a través de él.

Los genes mencionados y otras regiones presentes en la isla IG-*asnT* de *S. Enteritidis* presentan homología con regiones presentes en islas genómicas de otras enterobacterias: *Erwinia carotovora* subespecie *atroseptica* (patógeno de plantas), *Photobacterium luminescens* subespecie *laumondii* (patógeno de insectos) y *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, patógeno de humanos). Cabe destacar que en la isla genómica codificada en las cepas UPEC CFT073 y 536 también se identificó un gen que codifica una proteína con homología a dominios TIR, a la que se denominó TcpC (*TIR domain containing-protein C*). TlpA y TcpC comparten homología en los dominios TIR, pero difieren en el resto de la secuencia aminoacídica (26.9% identidad), sugiriendo que no comparten un origen común. Recientemente se demostró que TcpC también es capaz de reducir la capacidad de generar respuestas inflamatorias en células epiteliales y macrófagos, interfiriendo con las señales mediadas por el dominio TIR [Cirl y cols., 2008]. Además, se demostró que TcpC es secretada al medio extracelular, para luego ser capturada e ingresada al interior de los macrófagos. Los mecanismos que median la secreción de esta proteína no han sido descritos, pero se descartó la participación de un SSTT, porque UPEC no posee este tipo de sistema codificado en su genoma. También se descartó un sistema de secreción tipo II, porque TcpC no posee la secuencia líder característica que presentan las proteínas secretadas por estos sistemas. Cabe la posibilidad que TlpA se produzca y se secrete de forma análoga a TcpC, por mecanismos que involucren la participación de los genes presentes en la isla genómica en la que se encuentran codificadas.

1.6. Papel de la isla IG-*asnT* de *S. Enteritidis* en virulencia

De acuerdo a resultados obtenidos en nuestro laboratorio, varias de las proteínas codificadas en la isla IG-*asnT* participarían en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) en un modelo murino de virulencia *in vivo* [Silva, 2009]. Dentro de estas proteínas se encuentra TlpA, las supuestas proteínas estructurales de un pilus tipo IV, una proteína con homología a reguladores transcripcionales de la familia H-NS, los cuales se han visto implicados en la regulación de la expresión de genes adquiridos mediante transferencia horizontal en *S. Typhimurium* [Lucchini y cols., 2006; Navarre y cols., 2006], y finalmente una proteína con una región homóloga a dominios MobA, presentes en proteínas que participan en la transferencia de plasmidios conjugativos. Otras proteínas hipotéticas que mostraron un papel en la colonización de órganos internos murinos no poseen dominios homólogos a proteínas conocidas.

Cabe destacar que la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y proliferar dentro de macrófagos, evitando su acción bactericida, es un factor trascendental para poder colonizar órganos y generar una infección sistémica [Takaya y cols., 2003, Leung y cols., 1991, Schwan y cols., 2000]. Dentro de los macrófagos la bacteria puede diseminarse a través del sistema circulatorio y alcanzar los órganos internos. De esta forma, además de *tlpA*, es posible que otros genes presentes en la isla IG-*asnT* codifiquen proteínas que cumplan un papel en la supervivencia de la bacteria al interior de células fagocíticas, o que le permitan escapar del macrófago infectado [Schwan y cols., 2000]. En relación a este punto, se ha descrito la acción de proteínas como IpaB en *Shigella* y SipB en *Salmonella*, que son capaces de inducir piroptosis en los macrófagos que infectan [Hersh y cols., 1999]. Esta acción es mediada por caspasa-1, la misma que permite la secreción de IL-1 β , en la que TlpA se vio involucrada en *S. Enteritidis* [Newman y cols., 2006].

Comprender la forma en que las proteínas codificadas en la isla IG-*asnT* contribuyen con la virulencia de *S. Enteritidis* nos puede entregar valiosa información sobre nuevos mecanismos de patogenicidad, permitiendo diseñar estrategias de control eficaces para este patógeno.

1.7. HIPOTESIS.

La isla IG-*asnT* codifica productos génicos que afectan la viabilidad intracelular de *S. Enteritidis* y/o de macrófagos murinos infectados con la bacteria. Al menos uno de estos productos participa en la producción y/o secreción de la proteína TlpA.

1.8. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si la isla IG-*asnT* codifica productos génicos que afectan la viabilidad intracelular de *S. Enteritidis* y/o de macrófagos murinos infectados con la bacteria y definir si alguno de ellos participa en la producción y/o secreción de la proteína TlpA.

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Ensayar la supervivencia intracelular de mutantes definidas en la isla IG-*asnT* en macrófagos murinos *in vitro*.
- 2.- Comparar el efecto producido por cepas con deleciones en genes de la isla IG-*asnT* sobre la viabilidad de los macrófagos infectados, en relación a la cepa silvestre.
- 3.- Determinar si *S. Enteritidis* produce y secreta la proteína TlpA *in vitro*.
- 4.- Demostrar si los productos génicos codificados en la isla IG-*asnT* participan en la producción y/o secreción de la proteína TlpA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos.

De Difco Laboratories (Detroit, MI, EEUU) se obtuvo: triptona, extracto de levadura, Bacto-Agar, casaminoácidos.

De Gibco BRL (Grand Island, NY, EEUU) se obtuvo: dodecilsulfato de sodio (SDS), bromuro de etidio, agarosa.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: T4 DNA ligasa, dNTPs, Go-Taq DNA polimerasa.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: Azul de Tripán 0,4%, anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidada (HRP).

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, glucosa, ramnosa, cloroformo, acetona, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, glicerol, ácido clorhídrico, isopropanol, hidróxido de sodio, amortiguador TAE 50x.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, L-arabinosa, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicina, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), desoxicolato de sodio, *Gen Elute bacterial genomic DNA kit*, azul de Coomassie *Brilliant Blue R*.

De Thermo Scientific (HyClone) se obtuvo: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, High glucose), suero fetal bovino (SFB), PBS 10x, solución gentamicina 50 mg/mL, films fotográficos CL-X.

De Winkler Ltda se obtuvo: Tris base, albúmina se suero bovino (BSA).

De Millipore se obtuvo: filtros de nitrocelulosa 0,025 μm , columnas de ultracentrifugación *Amicon Ultra-4* (retención de proteínas ≥ 10 kDa), membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

De Fermentas se obtuvo: Estándares de peso molecular *GeneRuler* 1kb para DNA, Estándar de proteínas preteñido *PageRuler*, enzima de restricción *NdeI*, fosfatasa alcalina intestinal de ternero (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP).

De Qiagen se obtuvo: *QIAprep Spin Miniprep kit*, *QIAquick Gel extraction kit*, *QIAquick PCR purification kit*.

De Biorad se otuvo: Solución Acrilamida/bisacrilamida 40%, Solución *BioRad Protein Assay* para cuantificar proteínas.

De Fermelo S.A. se obtuvo: todos los oligonucleótidos partidores utilizados.

De Pierce se obtuvo: sustratos quimioluminiscente para HRP *Super Signal West Pico*.

De Stratagene se obtuvo: Pfu Taq polimerasa, anticuerpo monoclonal anti Flag M2.

De Roche se obtuvo: mezcla de inhibidores de proteasa *Complete Mini EDTA-free*.

2.2. Cepas Bacterianas.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis.

Cepa	Genotipo/Fenotipo relevante	Fuente o referencia
S. Enteritidis PT4	Cepa silvestre del fagotipo PT4	Thomson y cols., 2008
Δ SEN1976-1999	PT4 ,Cm ^R , deleción de los genes SEN1976 al SEN1999 de la isla IG- <i>asnT</i>	Este trabajo
Δ SEN1971-1999	PT4, Cm ^R , deleción completa de la isla IG- <i>asnT</i>	Silva, 2009
Δ <i>tlpA</i>	PT4 Δ SEN1975 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1977	PT4 Δ SEN1977 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1980	PT4 Δ SEN1980 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1982	PT4 Δ SEN1982 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1986	PT4 Δ SEN1986 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1993	PT4 Δ SEN1993 Cm ^R	Este trabajo
Δ SEN1995	PT4 Δ SEN1995 Cm ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag	PT4 con la fusión cromosomal de epítotope 3xFlag en el extremo 3' del gen <i>tlpA</i> , Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1976-1999	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1977	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1980	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1982	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1986	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1993	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
<i>tlpA</i> 3xFlag Δ SEN1995	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
PT4 pTlpA3xFlag	PT4 transformada con el plasmidio inducible pTlpA3xFlag, Kan ^R	Este trabajo
PT4 pTlpA3xFlag Δ SEN1976-1999	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
PT4 <i>cam</i> 3xFlag pTlpA3xFlag	Cm ^R Kan ^R	Este trabajo
PT4 <i>tlpA-lacZ</i>	Kan ^R , lacZY ⁺	Este trabajo
PT4 <i>tlpA-lacZ</i> Δ SEN1976-1999	Kan ^R , lacZY ⁺ , Cm ^R	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> - Φ 80 <i>lacZ</i> M15 <i>endA</i> <i>recA</i> <i>hsdR</i> (<i>r-k</i> <i>m-k</i>) <i>supE</i> <i>thi</i> <i>gyrA</i> <i>relA</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Stock del laboratorio

2.3. Plasmidios.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en la presente Tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o referencia
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>bet exo</i> pSC101 <i>oriT^S</i> , Amp ^R	Datsenko y cols., 2000
pCP20	<i>bla cat</i> <i>cl857</i> IPR <i>flp</i> pSC101 <i>oriT^S</i> , Cm ^R , Amp ^R	Datsenko y cols., 2000
pSUB11	Amp ^R , Kan ^R , 3xFlag epítoto	Uzzau y cols., 2001
pCLF2	<i>bla</i> , Amp ^R , Cm ^R , secuencias FRT	Stock del laboratorio
pSC rhaB2	<i>ori_{pBBR1}</i> <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , <i>P_{rhaB}</i> T _p ^R <i>mob⁺</i>	Cardona y cols., 2005
pTlpA3xFlag	fusión <i>tIpA3xFlag</i> clonada bajo el control del promotor <i>P_{rhaB}</i> en el vector pSC rhaB2	Este trabajo
pCE36	<i>ahp</i> , Kan ^R , FRT <i>lacZY⁺</i> <i>t_{his}</i> <i>oriR6K</i>	Ellermeier y cols., 2002

2.4. Partidores.

Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis.

Nombre	Partidor
TlpA3xFlag F	CATTGATGAAATTGCTGAACAGCTTGAATCATTATTGAAAGACTACAAAGACCATG ACGG
TlpA3xFlag R	TCCCAAGTGATATGTATTCTCTCCAATGGAGAGTTCCCTTCATATGAATATCCTCC TTAG
TlpA NdeI	GGAATCCCATATGTCTATAAGCACCACAAT
P2 BamHI	CGGGATCCCGCATATGAATATCCTCCTTAG
P1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
lac	GACCATTTTCAATCCGCA
kan	TTTCTAGAGCTGTTAAAAGGACA
C3	CCGGACAATTAAGGTGCTGT
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
pSCRhaB1	CACGTTTCATCTTTCCCTGGT
SEN1976 (H2P2)	ACAGTTAACATTATTGGCATGCATATAATCTTCTGTAATT <u>CATATGAATATCCTCCT</u> <u>TAG</u>

SEN 1971-1999 (H1P1)	TTTTAGGGAAAAGAATGACAAAAAGATTGCCTGTCGCGGAGATAG <u>TGCAGGCTG GAGCTGCTTC</u>
SEN1999 out 5'	TGAACGATCTTCCTGTGCTG
SEN1975 (H1P1)	AGTTAATCTGATGTCTATAAGCACCACAATGTCAAATATCGTGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTC</u>
SEN1975 (H2P2)	AATATTTATTTCAATTAATGATTCAAGCTGTTCAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1975 out 5'	CTAAGCACCTTTACCAGCGG
SEN1977 (H1P1)	GGGGCACTTTATGCCCTTTTTGGATCATATTTTCAGATGGTGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTC</u>
SEN1977 (H2P2)	ATTTAAATAGTCATTGTGCCTGAACGATATAATTCATGGCCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1977 out 5'	AGCGCAAGCGGAAAGTAATA
SEN1980 (H1P1)	TAATTTATTAATGGCGATTTTTCATCTGGATTTTAAAATTGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SEN1980(H2P2)	TTCTATTTTGCTATTTCATTATAATTATTATTACGATATGCCACATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1980 out 5'	CGGACGTGAAACCTACACCT
SEN1982 (H1P1)	GATTATCAGGATGGATAAGCAGATGAAGAAGATTTTACTCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SEN1982 (H2P2)	ATTGGTTTCCTTAATTGGCTTTCCAGCCATTGCTGGTCTTCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1982 out 5'	CCGTCCAGAACTCCGTA
SEN1986 (H1P1)	AGGATGAGCGATGGAAGGTCAGTTAATTTTTGTTCCGATGTGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTC</u>
SEN1986 (H2P2)	AAAATATCAACTAAGGTATAATCTGAATAGACTCAGACATCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1986 out 5'	AAACGGAAAAGCATCACAGG
SEN1993 (H1P1)	ACAACATACTATGAGTGAAGCTCTCAAGGCACTGAACAATGTGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTC</u>
SEN1993 (H2P2)	TTTATTGTGATCAGAGTGCGAAGTCTTCCAGTTTTTTACCCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1993 out 5'	ACAGAAGCCGCTGTTGAGTT
SEN1995 (H1P1)	AGGAAATTACATGAGCACCGCAACTGACTTTAAGACACTCGTGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTC</u>
SEN1995 (H2P2)	TAAAGTGGGACTAATTATGTATAGGTACGTCGATTCTATCCATATGAATATCCTCCTTAG
SEN1995 out 5'	CCGGACAATTAAGGTGCTGT

Las secuencias que hibridan con las regiones P1 y P2 en el plasmidio pCLF2 están subrayadas (ver más adelante).

2.5. Medios de cultivo.

2.5.1. Cultivo bacteriano.

Las bacterias se cultivaron a 37°C en forma aeróbica en caldo Luria (CL, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L) o en medio mínimo N [0,1 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 7,5 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM K₂SO₄, 1 mM KH₂PO₄, 0,2% (v/v) glicerol, 0,1% (p/v) casaminoácidos, 8 μM MgCl₂] ajustado a pH 5,5. Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en placas de agar Luria (AL) [CL suplementado con 15 g/L de Bacto agar]. Aquellas cepas que contenían plasmidios de replicación termosensible (pKD46, pCP20) se incubaron a 30°C. Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) 100 μg/mL, kanamicina (Kan) 50 μg/mL, cloranfenicol (Cm) 20 μg/mL.

2.5.2. Cultivo celular.

Los macrófagos de origen murino J774 se mantuvieron en botellas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB en un incubador a 37°C con 5% CO₂/95% aire. El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 2 a 3 días. El día previo a cada ensayo las células se soltaron de la botella con un rastrillo para cultivo celular, se lavaron con PBS estéril y se resuspendieron en medio fresco, para ser contadas usando una cámara de Neubauer. Finalmente, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una razón de 1 x 10⁵ células por pocillo, o en placas de 6 pocillos a una razón de 1,5 x 10⁶ células por pocillo, para que formaran una monocapa con una confluencia de aproximadamente 80 a 100%.

2.6. Generación de mutantes en los marcos de lectura seleccionados de la isla IG-*asnT*.

2.6.1. Obtención del producto de PCR para la mutagénesis.

Las cepas mutantes con deleciones definidas en regiones o marcos de lectura presentes en la isla IG-*asnT* se generaron por reemplazo alélico mediante una modificación del método “Red-swap” descrito por Datsenko y Wanner (2000) [Santiviago y cols., 2009]. Se diseñaron partidores de 60 pb [SEN1975 (H1P1), SEN1975 (H2P2), SEN1977 (H1P1), SEN1977 (H2P2), SEN1980 (H1P1), SEN1980 (H2P2) SEN1982 (H1P1), SEN1982 (H2P2), SEN1986 (H1P1), SEN1986 (H2P2), SEN1993 (H1P1), SEN1993 (H2P2), SEN1995 (H1P1), SEN1995 (H2P2), SEN1976 (H2P2) y SEN1999 (H1P1)] cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las secuencias que flanquean las regiones o marcos de lectura a mutar. Los extremos 3' de los partidores contienen 20 nucleótidos cuya secuencia hibrida perfectamente con secuencias presentes en el plasmidio pCLF2 (subrayadas en las secuencias, ver **Tabla 3**). Este plasmidio posee un “cassette” compuesto por el gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa; resistencia a Cm) flanqueado por la secuencia FRT, que es reconocida por la recombinasa Fip. Usando el plasmidio pCLF2 como templado, se generaron los productos de PCR según el siguiente protocolo:

Mezcla:		
C inicial	1x (µL)	C Final
Agua	33,2	
Amortiguador Go-Taq (5x)	10	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 mM c/u
Partidor F (H1P1) 10 uM	1	0,2 uM
Partidor R (H2P2) 10 uM	1	0,2 uM
Go-Taq	0,3	
DNA plasmidial	0,5	
Final	50	

Protocolo de amplificación:

95°C	2 min	}	30 ciclos
95°C	30 s		
55°C	30 s		
72°C	1,5 min		
72°C	5 min		
4°C	∞		

Los productos de PCR generados se purificaron en columnas de *QIAquick PCR purification kit* y luego se dializaron en filtros de nitrocelulosa de 0,025 μm (Millipore).

2.6.2. Mutagénesis.

La mutagénesis se realizó sobre la cepa silvestre de *S. Enteritidis* PT4 transformada con el plasmidio termosensible pKD46 (**Tabla 2**). Éste contiene los genes que codifican para las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control del promotor inducible por arabinosa P_{araBAD} . Para obtener la cepa *S. Enteritidis* PT4/pKD46, se prepararon células electrocompetentes de la cepa silvestre: las bacterias se cultivaron a 37°C en CL con agitación hasta una OD_{600} de 0,6. Se centrifugó 3 mL del cultivo a 13.000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 μL de H_2O bidestilada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente a 10.000 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 μL de H_2O bidestilada. Se mezclaron 50 μL de células electrocompetentes con DNA (2 μL) de plasmidio pKD46 previamente dializado en filtros de nitrocelulosa de 0,025 μm y se electrotransformó en un electroporador “*E. coli* PulserTM” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 kV. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de CL y se incubó a 30°C por 60 min. Luego, se sembró 100 μL de las células transformadas en placas de AL con Amp y se incubó toda la noche a 30°C. Finalmente se seleccionó uno de los clones resistentes a Amp. La cepa *S. Enteritidis* PT4/pKD46 así construida se creció a 30°C con agitación, hasta una OD_{600} de 0,6 en 20 mL de CL con Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y L-arabinosa (20 mM) para inducir la expresión de la recombinasa Red. Luego, se prepararon células electrocompetentes como se describió anteriormente y se mezclaron 50 μL de

bacterias con 15 μ L de producto de PCR concentrado y dializado. Se electrotransformó en un electroporador “*E. coli* Pulser™” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 kV. Las transformantes se recuperaron en 1 mL CL a 37°C por 60 min para luego ser seleccionadas a 37°C en placas de AL suplementadas con Cm.

2.6.3. Comprobación de la mutagénesis.

El reemplazo alélico en cada mutante se confirmó por PCR utilizando un partidor interno al “cassette” de resistencia a cloranfenicol (partidor C3) y uno externo que flanquea al sitio mutagenizado en cada cepa (partidores SEN1975 out5, SEN1977 out5, SEN1980 out5, SEN1982 out5, SEN1986 out5, SEN1993 out5, SEN1995 out5 o SEN1976 out5). El protocolo utilizado fue el siguiente:

Mezcla:		
C inicial	1x (μ L)	C Final
Agua	11,1	
Amortiguador Go-Taq (5x)	0,4	1x
MgCl ₂ (25mM)	1,6	2 mM
dNTPs (10mM c/u)	0,4	0,2 mM
Partidor F (out 5') 10 uM	0,4	0,2 uM
Partidor R (C3) 10 uM	0,4	0,2 uM
Go-Taq (Promega)	0,1	
Suspensión bacteriana	2,0	
Final:	20	

Protocolo de amplificación:

95°C	2 min	} 30 ciclos
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	1,5 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

2.6.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Los productos obtenidos se resolvieron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). La electroforesis se realizó a 80 V constantes por 40 min. Como marcador de peso molecular de DNA se utilizó un estándar de 1 kb. Posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) por aproximadamente 10 min. Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

2.7. Construcción de las cepas de *S. Enteritidis* PT4 con la fusión cromosomal *tIpA3xFlag*.

2.7.1. Incorporación del epítoto 3xFlag en el extremo C terminal de la proteína TIpA en *S. Enteritidis* PT4.

Para poder detectar la expresión de la proteína TIpA de *S. Enteritidis* PT4 se fusionó el epítoto comercial 3xFlag en el extremo 3' del gen que codifica esta proteína (*SEN1975*, *tIpA*). Para construir esta fusión en el cromosoma bacteriano se utilizó el método descrito por Uzzau y colaboradores (2001). Se diseñaron partidores de 60 pb (TIpA3xFlag F y TIpA3xFlag R) cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a la región C-terminal del gen *tIpA* y cuyo extremo 3' contiene 20 nucleótidos cuya secuencia hibrida con secuencias presentes en el plasmidio pSUB11. Este plasmidio contiene la secuencia que codifica el epítoto 3xFlag, más un cassette de resistencia a kanamicina que sirve como marcador de selección. Usando el plasmidio pSUB11 como templado, se generaron los amplicones de esta región según el siguiente protocolo:

Mezcla:		
C inicial	1x (µL)	C Final
Agua	33,2	
Amortiguador Go-Taq (5x)	10	1x
MgCl ₂ (25mM)	3	1,5 mM
dNTPs (10mM c/u)	1	0,2 mM
Partidor TlpA3xFlag F 10 uM	1	0,2 uM
Partidor TlpA3xFlag R 10 uM	1	0,2 uM
Go-Taq	0,3	
DNA plasmidial	0,5	
Final:	50	

Protocolo de amplificación:

95°C	2 min	}	30 ciclos
95°C	30 s		
55°C	30 s		
72°C	2 min		
72°C	5 min		
4°C	∞		

Los productos de PCR generados se purificaron en columnas de *QIAquick PCR purification kit* y luego se dializaron en filtros de nitrocelulosa de 0,025 µm. Posteriormente este producto de PCR se electroporó en la cepa silvestre de *S. Enteritidis* PT4 previamente transformada con el plasmidio pKD46 (véase punto 2.6.2).

2.7.2. Comprobación de la correcta construcción de la cepa *tIpA3xFlag*.

Las mutantes obtenidas se seleccionaron en placas de agar Luria suplementadas con Kan y se confirmaron por PCR utilizando un partidor interno al “cassette” de resistencia a Kan (partidor K1) y uno externo que flanquea al sitio donde se realizó la fusión cromosomal (partidor TlpA NdeI), según el siguiente protocolo:

Mezcla:		
C inicial	1x (μL)	C Final
Agua	11,1	
Amortiguador Go-Taq (5x)	0,4	1x
MgCl ₂ (25mM)	1,6	2 mM
dNTPs (10mM c/u)	0,4	0,2 mM
Partidor TlpA Ndel 10 uM	0,4	0,2 uM
Partidor K1 10 uM	0,4	0,2 uM
Go-Taq (Promega)	0,1	
Suspensión bacteriana	2,0	
Final	20	

Protocolo de amplificación:

95°C	2 min	} 30 ciclos
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	2 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa como se describe en el punto 2.6.4.

2.7.3. Transducción de las mutaciones en las regiones o genes de la isla IG-*asnT* a la cepa *tIpA3xFlag*.

Se construyeron cepas de *S. Enteritidis* PT4 que poseyeran a la vez la fusión cromosomal *tIpA3xFlag* y una delección en la región completa de los genes de interés (*tIpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999*) o una delección puntual en los marcos de lectura de interés (*tIpA3xFlag* Δ *SEN1977*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1980*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1982*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1986*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1993* y *tIpA3xFlag* Δ *SEN1995*). Para esto, se utilizó el bacteriófago P22 HT *int* para movilizar las mutaciones mencionadas sobre la cepa receptora *tIpA3xFlag* mediante transducción generalizada [Maloy y cols., 1996].

2.7.3.1. Preparación de los lisados de Fago de las cepas dadoras.

Se creció un cultivo de cada cepa dadora (Δ SEN1976-1999, Δ SEN1977, Δ SEN1980, Δ SEN1982, Δ SEN1986, Δ SEN1993 y Δ SEN1995) durante una noche en 3 mL de CL a 37°C. A 200 μ L de cada uno de estos cultivos se agregaron 2 mL de P22Broth (CL suplementado con $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg/mL, ácido cítrico $\times \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/mL, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 13 mg/mL, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 3,5 mg/mL, glucosa 0,2% y 100 μ l de un lisado concentrado del fago P22 HT *int*) y se incubó por toda la noche a 37°C en CL. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de cloroformo a cada uno y se agitó vigorosamente por 10 s usando un vortex. Se tomaron 1,5 mL de la fase superior, que se transfirieron a un tubo eppendorf y se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C. De la fase superior se tomó 1 mL y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 80 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 10 s usando un vortex y los tubos se dejaron decantar a 4°C.

2.7.3.2. Transducción.

Se cultivaron 3 mL de la cepa receptora *tlpA3xFlag* durante toda la noche a 37°C en CL. A 200 μ L de este cultivo se agregaron 5 μ L de cada uno de los lisados preparados, por separado. Como control se dejaron 200 μ L del cultivo de la cepa receptora sin agregar lisado de fago alguno. Los tubos se dejaron 15 min a temperatura ambiente para asegurar la adsorción del fago, y luego se agregó 1 mL de CL a cada uno. Se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 100 μ L de CL suplementado con EGTA 10 mM. Las suspensiones de bacteria se sembraron en placas de AL suplementadas con Kan y Cm. La correcta construcción de las cepas se confirmó por PCR, tanto para la fusión cromosomal *tlpA3xFlag* como para las mutaciones transducidas, según los protocolos descritos en los puntos 2.7.2 y 2.6.3, respectivamente.

2.7.3.3. “Cross streaking”.

Para verificar que las cepas transducidas estén limpia del fago P22 HT *int*, se realizó un “cross streaking”, que consiste en determinar la sensibilidad de la cepa al fago lítico P22 H5. Sólo las cepas limpias del fago P22 HT *int* son sensibles a la infección de P22 H5. Para este ensayo, se trazó una línea ecuatorial sobre una placa AL, usando 40 µL de un lisado del fago P22 H5 propagado en la cepa *S. Enteritidis* PT4. Una vez seca la placa, se sembraron las cepas a ensayar trazando una línea que cruzara en forma perpendicular a la del lisado (“cross streak”). Esta placa se incubó durante toda la noche a 37°C. Luego de esto, se observó si ocurría una interrupción del crecimiento en la línea de bacterias al cruzar por la del lisado. Cuando esto ocurrió, se consideró que la cepa era sensible al fago.

2.8. Inducción de la expresión del gen *tIpA* a partir de un vector inducible por ramnosa (pTIpA3xFlag).

2.8.1. Construcción del plasmidio pTIpA3xFlag.

2.8.1.1. Digestión y desfosforilación del plasmidio pSC rhaB2.

El plasmidio pSC rhaB2 (ver **Tabla 2**) se utilizó como base para generar el plasmidio pTIpA3xFlag. Este plasmidio se extrajo desde la cepa DH5α utilizando el *QIAprep Spin Miniprep kit*. El plasmidio extraído se digirió con la enzima *NdeI* en un volumen total de 100 µL (agua 34 µL, amortiguador 10x 10 µL, DNA 50 µL, *NdeI* 6 µL) durante toda la noche a 37°C. AL volumen total digerido se agregó 3 µL de fosfatasa alcalina intestinal de ternero (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) y se incubó a 37°C por 1 h. El volumen total se purificó en columnas de *QIAquick PCR purification kit*, concentrándose a un volumen de 40 µL de amortiguador.

2.8.1.2. Amplificación de la fusión *tIpA3xFlag* cromosomal para clonar en el vector.

Se cultivó la cepa *tIpA3xFlag* en CL a 37°C durante toda la noche. Se extrajo DNA genómico de esta cepa utilizando el *Gen Elute bacterial genomic DNA kit*. Usando este DNA como templado, se amplificó la región correspondiente a *tIpA3xFlag* con los partidores TIpA NdeI y P2 BamHI. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

Mezcla:		
C inicial	1x (µL)	C Final
Agua	40	
Amortiguador Pfu taq (10x)	5	1x
dNTPs (10mM c/u)	1	0,2 mM
Partidor TIpA NdeI 10 uM	1	0,2 uM
Partidor P2 BamHI 10 uM	1	0,2 uM
Pfu Taq pol	1	
DNA genómico	1	
Final	50	

Protocolo de amplificación:

95°C	2 min	} 30 ciclos
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	2,5 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

2.8.1.3. Digestión del amplicón *tIpA3xFlag*.

El producto obtenido se resolvió en un gel de agarosa 1% (véase punto 2.6.4). Desde el gel se cortó la banda del tamaño correspondiente al amplicón de *tIpA3xFlag* (2427 pb) y se purificó utilizando el *QIAquick Gel extraction kit*. El volumen total se digirió con la enzima *NdeI* (agua 4 μ L, amortiguador 0 10x 10 μ L, DNA 80 μ L, *NdeI* 6 μ L) durante toda la noche a 37°C. El volumen total de la digestión (100 μ L) se purificó en una columna de *QIAquick PCR purification kit*.

2.8.1.4. Ligación del amplicón *tIpA3xFlag* al vector pSC rhaB2.

El producto *tIpA3xFlag* digerido y purificado se ligó al vector pSC rhaB2 desfosforilado en su extremo 5' (ver punto 2.8.1.1). El volumen total de la reacción fue de 10 μ L (1 μ L amortiguador 10x, 3 μ L del vector digerido, 5 μ L del producto digerido, 1 μ L de ligasa T4) y se incubó a 4°C durante toda la noche. El volumen total se dializó y se electroporó en células DH5 α . Las células transformadas se sembraron en placas de AL suplementadas con Kan. Para comprobar la correcta orientación del producto ligado en el vector, se eligieron 10 de los clones crecidos y se realizó un PCR con los partidores pSCRhaB1 y K1 (ver **Tabla 3**). El protocolo utilizado fue el mismo descrito para el punto 2.7.2. Se eligieron dos clones de los que adquirieron el vector construido de forma correcta y se realizó una extracción plasmidial de estos clones, utilizando el *QIAprep Spin Miniprep kit*. El vector construido se denominó pTIpA3xFlag.

2.8.2. Construcción de las cepas PT4 pTIpA3xFlag, PT4 pTIpA3xFlag Δ SEN1976-1999 y PT4 *cat3xFlag* pTIpA3xFlag.

El plasmidio pTIpA3xFlag se electroporó en las cepas *S. Enteritidis* PT4, en la cepa mutante con la delección en los genes de interés de la isla (Δ SEN1976-1999) y también en la cepa PT4 *cat3xFlag*, que posee incorporado el gen de la cloranfenicol

acetiltransferasa fusionada al epítoto 3xFlag en el sitio de inserción del fago Gifsy-1. Para esto, se prepararon células electrocompetentes de las tres cepas y posteriormente se transformaron con 4 μ L del plasmidio pTlpA3xFlag previamente dializado. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de CL y se incubó a 37°C por 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas de AL suplementadas con Kan. Para comprobar la adquisición del plasmidio en ambas cepas, se realizó un PCR con los partidores pSCRhaB1 y K1 (ver **Tabla 3**). El protocolo utilizado fue el mismo descrito para el punto 2.7.2.

2.8.3. Inducción de la expresión de *tIpA3xFlag* desde el plasmidio inducible por ramnosa (pTlpA3xFlag).

Las cepas PT4 pTlpA3xFlag, PT4 pTlpA3xFlag Δ SEN1976-1999 y PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag se crecieron en CL a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6. Posteriormente, se indujo 1 h la expresión del gen *tIpA3xFlag* clonado en el plasmidio pTlpA3xFlag agregando ramnosa al medio de cultivo hasta una concentración final de 0,1%. Posteriormente el cultivo se utilizó para analizar la presencia de la proteína TlpA en el extracto total de bacteria o en las distintas fracciones (citósol, membrana y sobrenadante de cultivo).

2.9. Producción y secreción de la proteína TlpA3xFlag.

2.9.1. Obtención de proteínas de extractos bacterianos totales.

Las cepas en estudio se crecieron a 37°C en CL o en medio mínimo N a pH 5,5. A determinada OD₆₀₀, las bacterias se centrifugaron a 4.000 x g por 15 min para separar el sobrenadante de cultivo del sedimento bacteriano. La cantidad de bacterias se

estandarizó por OD₆₀₀. El sedimento bacteriano se resuspendió en amortiguador de carga para SDS-PAGE.

2.9.2. Separación de las fracciones citosólicas y de membrana de los lisados bacterianos.

Las cepas en estudio se crecieron a 37°C en CL. A determinada OD₆₀₀, las bacterias se lavaron con PBS 1x suplementado con EDTA 1mM y se resuspendieron en PBS suplementado con EDTA 1 mM con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete mini). Las muestras se sonicaron tres veces por 10 s o hasta obtener muestras transparentes y sin espuma. Se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm para eliminar las células completas y luego se separó la fracción de membrana de la citosólica mediante centrifugación (20.000g x 60 min). Las membranas se resuspendieron en PBS EDTA 1 mM con inhibidores de proteasas.

2.9.3. Obtención de proteínas de sobrenadantes de medios de cultivo.

Las cepas en estudio se crecieron a 37°C en 50 ml de CL. A determinada OD₆₀₀, las bacterias se centrifugaron a 4.000 x g por 15 min para separar el sobrenadante de cultivo del sedimento bacteriano. El sobrenadante se esterilizó con un filtro de 0,22 µm. Las proteínas presentes en 40 mL se precipitaron con TCA 10%, incubando en hielo por 40 min. Posteriormente, se centrifugó a 7.000 x g por 20 min y el sedimento se lavó con acetona fría. Luego de una nueva centrifugación a 7.000 x g por 20 min, el pellet se resuspendió en 4 mL de PBS. La solución se transfirió a una columna de ultracentrifugación *Amicon Ultra-4*, que permite concentrar las proteínas y filtrar las moléculas con un tamaño menor a 10 kDa (Millipore). Las proteínas concentradas se lavaron una vez con 4 mL de PBS. El volumen final obtenido en la columna se transfirió a un tubo de centrifuga para su cuantificación.

2.9.4. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando el kit comercial *BioRad Protein Assay*. La curva estándar se realizó con soluciones de concentraciones crecientes de sero-albúmina bovina (BSA) en PBS (0-500 µg/mL). La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro a 620 nm.

2.9.5 Electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los geles de acrilamida/bis-acrilamida (A/BA) se prepararon al 12% a partir de una solución stock de A/BA 40% en proporción 37,5/1. Los geles se pre-corrieron en amortiguador de electroforesis 1x (Tris 0,125 M, glicina 0,96 M, SDS 0,5%) a 90 V por 20 min. Posteriormente, 20 µg de proteínas de cada muestra se cargaron con amortiguador de carga para SDS-PAGE 1x y se corrieron a 70 V durante la migración de la muestra en el gel concentrador y luego a 100 V hasta la caída del frente de corrida (azul de bromofenol).

2.9.6. Electrotransferencia e inmunoblot.

La electrotransferencia se realizó por vía húmeda. Las membranas de PVDF se activaron con metanol 100% por 30 s, lavadas en agua miliQ por 2 min y luego equilibradas en amortiguador de electrotransferencia 1x (14,4 g/L glicina, 3,03 g/L Tris) preparado con isopropanol 20%. La transferencia se realizó por 1 h a 100 V constantes. Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA 3% en TBS 1x (Tris 2,42 g/L, NaCl 8,4 g/L ajustado a pH 7,5) durante la noche. Luego, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:20.000 de un anticuerpo monoclonal anti-Flag de ratón en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS Tween 0,2%. El segundo anticuerpo anti-ratón unido covalentemente a una peroxidasa se preparó a una dilución de 1:20.000 en TBS 1x. Las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo por 1 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 10 min

con TBS Tween 0.2%, se revelaron las membranas utilizando el sustrato quimioluminiscente *West Pico*.

2.10. Cuantificación de la actividad del promotor del gen *tlpA* en cepas de *S. Enteritidis* PT4.

2.10.1. Construcción de las cepas con fusión transcripcional PT4 *tlpA-lacZ*.

La cepa $\Delta tlpA$ se sembró en CL a 37°C, se prepararon células electrocompetentes y se transformaron con el plasmidio pCP20. Este plasmidio tiene clonado el gen que codifica para la recombinasa sitio-específica FLP, que reconoce los sitios FRT, lo que permitió eliminar los genes de resistencia a antibiótico de las diferentes mutantes dejando una copia del sitio FRT y una deleción en el gen interrumpido. Se seleccionaron varias colonias transformadas con el plasmidio pCP20 y se sembraron por triplicado en placas de AL suplementadas con Amp y AL suplementadas con Cm y se incubaron a 30°C durante toda la noche. Se seleccionaron aquellos clones que crecieran en placas de AL suplementadas con Amp y no crecieran en placas de AL suplementadas con Cm. La pérdida del cassette se corroboró por PCR con los partidores P1BamH1 y P2, de acuerdo al protocolo descrito en el punto 2.6.3. Posteriormente, la cepa sin el cassette y con el plasmidio pCP20 se creció a 30°C en CL suplementado con Amp y se transformó con el plasmidio pCE36, que se integra específicamente en los sitios FRT que quedan como cicatriz tras escindir el cassette, gracias a la recombinasa FLP codificada en el plasmidio pCP20. En el plasmidio pCE36 están codificados los genes *lacZ* y *lacY* sin el promotor [Ellermeier y cols., 2002]. De esta forma, se genera una fusión transcripcional del promotor del gen mutado con el gen *lacZ* y *lacY*. Las cepas transformadas se incubaron 1 h a 37°C y luego se sembraron en placas de AL suplementadas con Kan. Las placas se incubaron a 37°C para seleccionar aquellos clones que adquirieron el plasmidio pCE36. A los clones crecidos se les realizó un PCR para comprobar la correcta orientación del plasmidio integrado en el genoma. Aquellos clones que amplifican un producto con los partidores P1 y lac y no amplifican con los partidores lac y kan poseen una fusión

transcripcional construida correctamente. Los protocolos de amplificación se describen en el punto 2.6.3.

Posteriormente, un clon positivo de la cepa PT4 *tlpA-lacZ* se usó como cepa receptora de la delección en los genes Δ SEN1976-1999. Para esto, se utilizó el bacteriófago P22 HT *int* para transducir la mutación mencionada en la cepa receptora PT4 *tlpA-lacZ*. El protocolo se describió en el punto 2.7.3. De esta forma se generó la cepa PT4 *tlpA-lacZ* Δ SEN1976-1999, que permitió estudiar la actividad del promotor de *tlpA* en ausencia de los genes de interés de la isla IG.*asnT*.

2.10.2 Medición de la actividad β -galactosidasa.

Las cepas bacterianas se cultivaron en 3 mL de CL con los antibióticos correspondientes a 37°C durante toda la noche. De estos cultivos se tomó una alícuota de 40 μ L y se subcultivaron llevándolos a 20 mL de medio fresco. Se crecieron a 37°C con agitación. A distintos tiempos se tomó una alícuota de 1 mL y se midió la OD₆₀₀. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada, se tomó alícuotas de 0,2 mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL con amortiguador Z (Na₂HPO₄ x 7H₂O 60 mM, NaH₂PO₄xH₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄x7H₂O 1 mM, pH 7,0 y β -mercaptoetanol 50 mM agregado al momento de usar). Las células se permeabilizaron con 20 μ L de CHCl₃ y 10 μ L de SDS al 0,1 % agitando vigorosamente en vortex durante 15 s. Se incubó a 30°C durante 10 min y se agregó 0,2 mL del sustrato orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) (4 mg/mL). Al aparecer una coloración amarilla, la reacción se detuvo agregando 0,5 mL de Na₂CO₃ 0,5 M. El tiempo de detención se registró para poder medir la actividad de cada muestra tomada. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

2.11. Ensayos de infección *in vitro* usando macrófagos murinos J774.

2.11.1. Ensayos de supervivencia intracelular de cepas de *S. Enteritidis* PT4 en macrófagos.

El ensayo utilizado se basó en el protocolo descrito por Schwan y cols. (2000). Los macrófagos se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% SFB a 37°C en un incubador con 5% CO₂/95% aire. Para el ensayo, ~10⁵ células se sembraron en cada pocillo en placas de 96 pocillos. Previo a la infección, las cepas de *S. Enteritidis* se crecieron toda la noche a 37°C en CL con agitación. El día del ensayo se inocularon en 10 mL de CL (dilución 1:20) y se crecieron hasta una OD₆₀₀ ~0.6. El volumen necesario para obtener una multiplicidad de infección de 50 bacterias por célula (MOI 50) se diluyó en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Los macrófagos se lavaron con PBS y se pusieron en contacto con las bacterias por 45 min (tiempo 0). Luego, los pocillos se lavaron con PBS y las células se incubaron a 37°C por 2 h con medio suplementado con gentamicina 200 µg/mL (tiempo 2 h). Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y el medio se cambió por uno suplementado con gentamicina 50 µg/mL. Las células se incubaron hasta cumplir 6 h de incubación totales tras la infección (tiempo 6 h). A los tiempos 0, 2 y 6 h, un triplicado de cada cepa evaluada se lisó con desoxicolato 0,5% en PBS. Diluciones seriadas en PBS de estos lisados se sembraron en placas de AL suplementadas con Cm para el posterior conteo de bacterias viables (unidades formadoras de colonia, UFC). La fórmula utilizada para calcular las UFC totales en determinado volumen fue la siguiente:

$$UFC = \frac{X \text{ colonias} * \text{volumen total}}{\text{volumen sembrado}} * \text{Factor Dilución}$$

Para calcular la capacidad de infectar y sobrevivir al interior de los macrófagos de las cepas evaluadas, las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\% \text{ Internalización} = \frac{UFC \text{ recuperadas al } t0h * 100}{X \text{ UFC inoculadas}}$$

$$\% \text{ Supervivencia } t2h = \frac{UFC \text{ recuperadas al } t2h * 100}{UFC \text{ recuperadas al } t0h}$$

$$\% \text{ Supervivencia } t6h = \frac{UFC \text{ recuperadas al } t6h * 100}{UFC \text{ recuperadas al } t0h}$$

2.11.2. Análisis Estadístico.

Los ensayos de infección en macrófagos se realizaron al menos tres veces en triplicado por cada cepa estudiada. Los análisis estadísticos de estos ensayos se realizaron utilizando el test “de una vía ANOVA” y el post-test “DUNNETT”, que permite comparar las diferencias entre las mutantes y la cepa silvestre.

2.11.3. Ensayo de viabilidad celular de macrófagos infectados con cepas de S. Enteritidis.

Los ensayos de infección se realizaron según lo descrito en el punto 2.11.1, exceptuando que esta vez se agregó una solución de azul de Tripán 0,4% a cada pocillo en triplicado por cada punto (0, 2 y 6 h) y por cada cepa estudiada, en vez de lisar las células con desoxicolato de sodio 0,5%. Las células que mueren son permeables a este colorante y se pueden observar de color azul al microscopio. Las células se observaron con un lente 40x en un microscopio invertido, y se determinó el número de células teñidas de azul en tres campos por cada pocillo tras 5 min de haber agregado la solución de azul de Tripán.

2.11.4. Análisis de la producción y exportación de TlpA en macrófagos.

Los ensayos de infección se realizaron según lo descrito en el punto 2.11.1. Para obtener una cantidad de bacterias apropiada para poder detectar la proteína TlpA3xFlag, se utilizaron placas de 6 pocillos y se agregaron $1,5 \times 10^6$ macrófagos en cada pocillo. Las bacterias se inocularon a una MOI de 100 o 200. Tras las dos horas de infección, las células se lisaron con 100 μ L de desoxicolato de sodio 0,5% en PBS suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas. El contenido de cada pocillo se rastrilló y se transfirió a un tubo eppendorf. Cinco μ L de este lisado se diluyeron en PBS y se sembraron en placas de AL suplementadas con Cm para el conteo de bacterias recuperadas. El resto del lisado se centrifugó por 15 min a 13.000 rpm para precipitar las bacterias y separarlas del lisado de macrófago. Las bacterias precipitadas se lisaron con amortiguador de carga para SDS-PAGE, mientras que las proteínas totales presentes en el sobrenadante (lisado de macrófagos) se cuantificaron según lo descrito en el punto 2.9.4. Posteriormente, se realizó un inmunoblot para detectar la presencia de proteínas fusionadas al epítotope 3xFlag en ambas fracciones (véase puntos 2.9.5 y 2.9.6).

3. RESULTADOS

3.1. Obtención de mutantes de *S. Enteritidis* con deleciones definidas de marcos de lectura o regiones de la isla IG-*asnT*.

Para evaluar la función de los productos génicos codificados en la isla IG-*asnT* en la interacción de *S. Enteritidis* PT4 con macrófagos de origen murino, se construyeron distintas mutantes con deleciones de determinados marcos de lectura o regiones pertenecientes a la isla. Los marcos de lectura seleccionados para la mutagénesis (representados en la **Figura 2**) se escogieron de acuerdo a resultados previos de nuestro laboratorio que sugieren su participación en la capacidad de *S. Enteritidis* para colonizar órganos internos de ratones BALB/c en un modelo de virulencia *in vivo* [Silva, 2009].

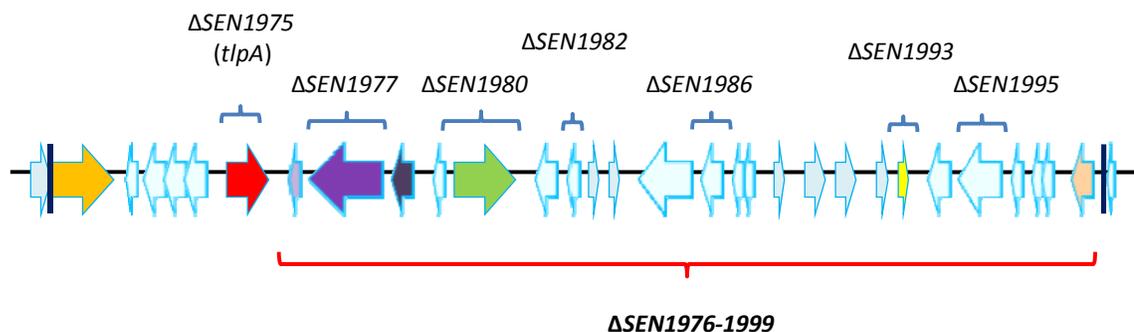


Figura 2. Marcos de lectura y regiones pertenecientes a la isla IG-*asnT* seleccionadas para mutagénesis. La región delimitada por las barras negras corresponde a la isla IG-*asnT*. Los marcos de lectura destacados en color presentan homología con secuencias de genes que codifican proteínas descritas previamente en la literatura. Aquellos genes o regiones que se eligieron para la mutagénesis se marcaron con paréntesis de llave.

Las cepas mutantes se generaron por reemplazo alélico mediante una modificación del método “Red-swap” descrito por Datsenko y Wanner (2000) [Santiviago y cols., 2009]. Cada marco de lectura o región de interés se reemplazó por un cassette de resistencia

a cloranfenicol, como se representa en la **Figura 3**. De esta forma las mutantes construidas pueden ser seleccionadas en placas de AL suplementadas con Cm.

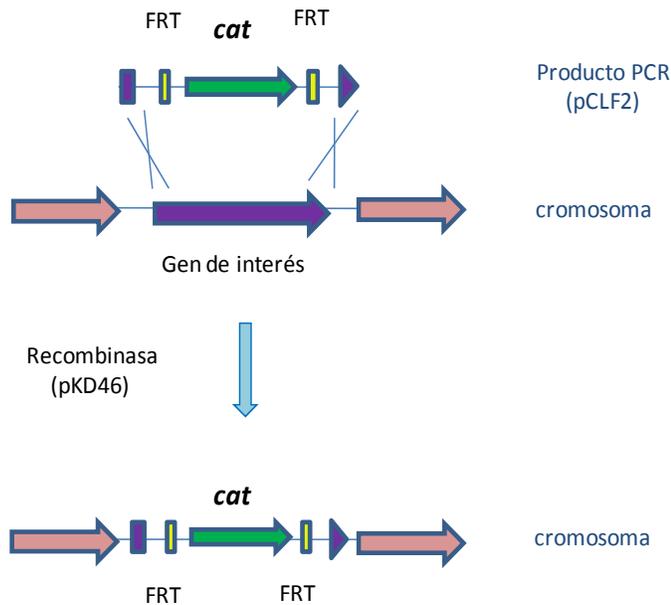


Figura 3. Esquema del reemplazo alélico que permite generar mutantes por delección de los genes de interés en el cromosoma de cepas de *Salmonella*. Las mutantes generadas expresan el gen de la cloranfenicol acetil transferasa, lo que permite seleccionar los clones en que se produjo la mutación en placas de AL suplementadas con Cm.

Para comprobar la correcta construcción de las mutantes, se realizaron amplificaciones mediante PCR usando un partidor que flanquea cada zona mutada (partidor out5') y otro partidor interno al cassette de resistencia (partidor C3). Los productos amplificados con estos partidores que se esperan para cada mutante construida son los siguientes:

Mutante	Tamaño del producto esperado
$\Delta tlpA$	683pb
$\Delta SEN1977$	931pb
$\Delta SEN1980$	766pb
$\Delta SEN1982$	1026pb
$\Delta SEN1986$	665pb
$\Delta SEN1993$	766pb
$\Delta SEN1995$	697pb
$\Delta SEN1976-1999$	707pb

En la **Figura 4** se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir de dos clones independientes por cada cepa, resueltos en un gel de agarosa. Para cada mutante se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado.

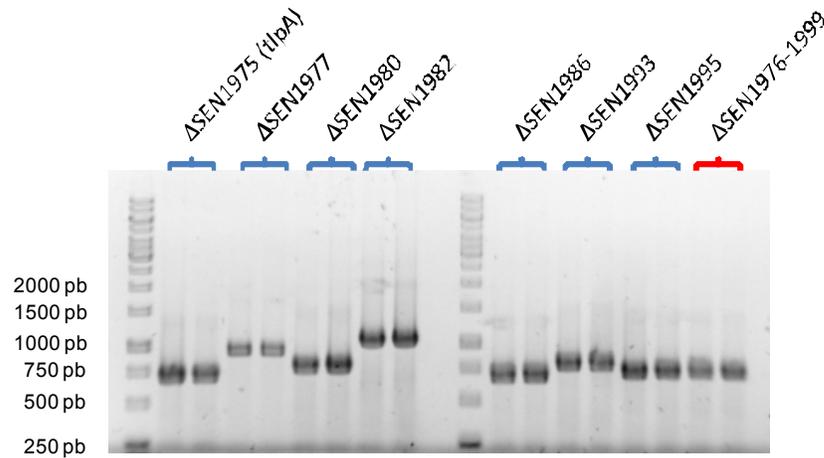


Figura 4. PCR de comprobación del reemplazo alélico producido en cada cepa construida. A la izquierda de la imagen se describen los tamaños moleculares de las bandas del estándar de peso molecular. Se obtiene para cada mutante el tamaño de producto esperado. En la fotografía se muestran los productos obtenidos para dos clones distintos por cada cepa, resueltos en geles de agarosa al 1%.

3.2. Mutantes de *S. Enteritidis* PT4 con deleciones definidas en marcos de lectura de la isla IG-*asnT* presentan una supervivencia intracelular disminuida en macrófagos murinos J774.

Las cepas de *S. Enteritidis* PT4 $\Delta tlpA$ (gen con homología a dominios TIR), $\Delta SEN1977$ (que presenta homología a subunidades estructurales de un pilus tipo IV), $\Delta SEN1980$ (que presenta en su secuencia dominios involucrados en transferencia de plasmidios), $\Delta SEN1976-1999$ (con una deleción en los genes de interés de la isla) y también la cepa $\Delta SEN1971-1999$ (con una deleción que comprende casi la totalidad de IG-*asnT*, construida previamente en el laboratorio) se evaluaron en su capacidad para sobrevivir en macrófagos de origen murino J774 y comparadas con la cepa silvestre. En la

Figura 5 se muestra el esquema del diseño experimental del ensayo de supervivencia intracelular *in vitro*, basado en el protocolo descrito por Schwan y cols. (2000).

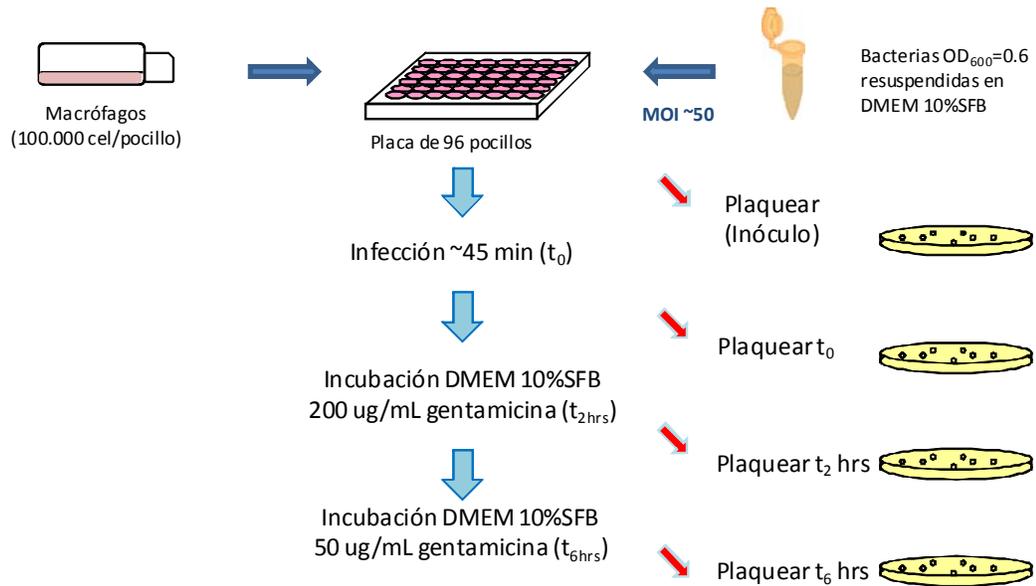


Figura 5. Esquema del ensayo de supervivencia intracelular *in vitro* de *S. Enteritidis* PT4 en macrófagos de origen murino J774. A los tiempos 0, 2 y 6 horas, un triplicado de macrófagos infectados con cada cepa se lisó con desoxicolato 0,5% en PBS. Diluciones seriadas en PBS de estos lisados se sembraron en placas de agar Luria con cloranfenicol para el posterior conteo de bacterias viables (unidades formadoras de colonia, UFC).

Las curvas de supervivencia al interior de macrófagos J774 de las cepas de *S. Enteritidis* evaluadas se muestran en la **Figura 6**. Contrariamente a lo esperado, la cepa silvestre (*wild type*) no es capaz de proliferar de manera eficiente al interior de estos macrófagos. De todos modos, se observa una diferencia en las bacterias recuperadas entre la cepa silvestre y las mutantes ensayadas.

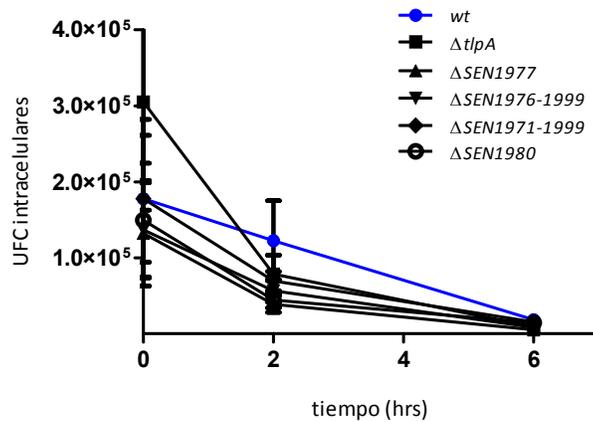


Figura 6. Curvas de supervivencia intracelular de cepas de *S. Enteritidis* al interior de macrófagos J774. Cada curva se obtuvo con cuatro experimentos independientes, en triplicado. Las barras verticales muestran la desviación estándar obtenida en cada punto.

Los porcentajes de internalización y de supervivencia intracelular de cada cepa estudiada se muestran en la **Figura 7** y **Figura 8**, respectivamente. En la **Figura 7** se observa que no existen diferencias significativas en la capacidad de infectar macrófagos entre ninguna de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre.

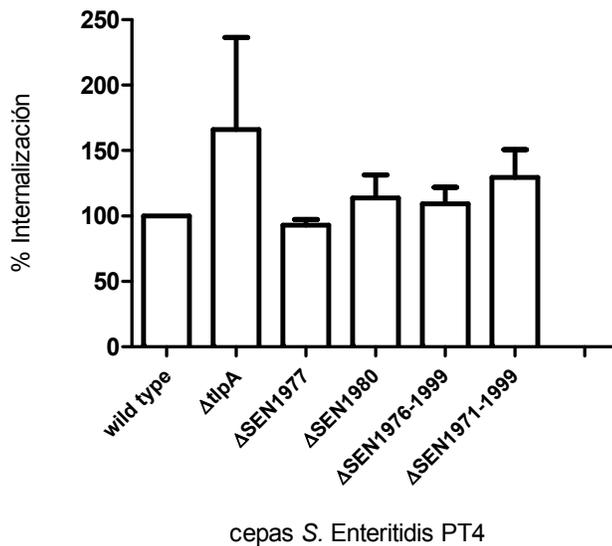


Figura 7. Porcentajes de internalización de cepas de *S. Enteritidis* al interior de macrófagos J774. Cada cepa se ensayó al menos en tres experimentos independientes, en triplicado. Las barras verticales muestran la desviación estándar obtenida en cada punto. Los datos se analizaron por el test “de una vía ANOVA” y el post-test “Dunnett”, sin arrojar diferencias significativas entre las cepas mutantes con la cepa silvestre.

En la **Figura 8** se muestran los porcentajes de supervivencia al interior de los macrófagos tras 2 horas (**Figura 8A**) y tras 6 horas de internalización (**Figura 8B**).

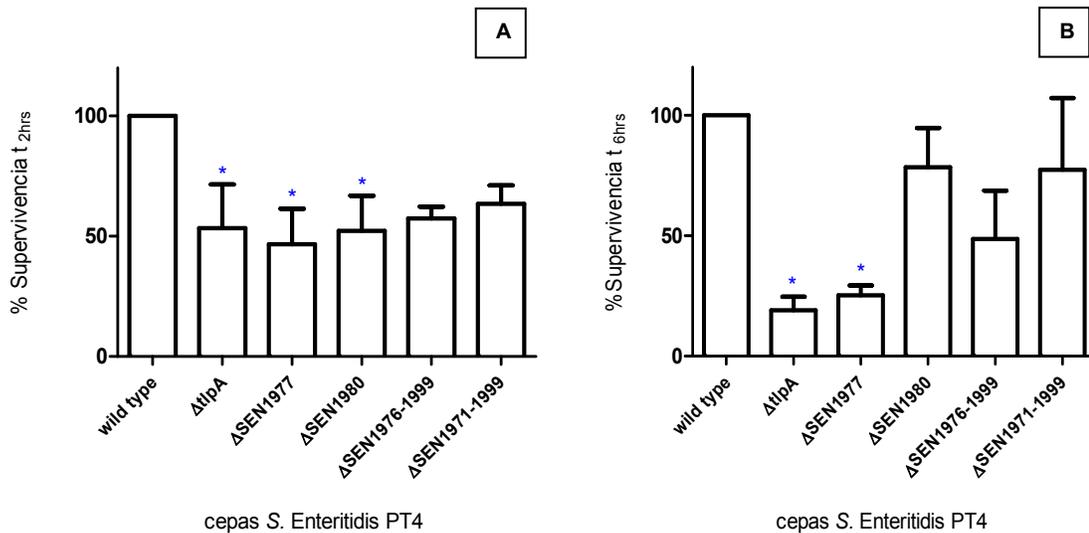


Figura 8. Porcentajes de supervivencia intracelular de cepas mutantes de S. Enteritidis con deleciones de genes o regiones de la isla IG-*asnT* en comparación a la cepa silvestre. Porcentajes de supervivencia intracelular A) tras dos horas de internalización B) tras seis horas de internalización. Por cada cepa se realizaron al menos tres experimentos independientes, en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida por cada punto. Los datos se analizaron por el test “de una vía ANOVA” y el post-test “Dunnett”. Aquellos valores que resultaron significativamente diferentes a la cepa silvestre están indicadas por asteriscos (*: $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos muestran que mutantes de S. Enteritidis PT4 con deleciones en genes pertenecientes a la isla IG-*asnT* presentan una menor supervivencia en macrófagos de origen murino J774 en comparación con la cepa silvestre a los tiempos estudiados. La diferencia es significativa para las cepas con deleciones en los genes puntuales $\Delta tlpA$, $\Delta SEN1977$ y $\Delta SEN1980$ ($p < 0.05$) tras dos horas de supervivencia (**Figura 8A**) y significativa sólo para las cepas $\Delta tlpA$ y $\Delta SEN1977$ ($p < 0.05$) transcurridas seis horas al interior de los macrófagos (**Figura 8B**). Los porcentajes de supervivencia promedio de las cepas mutantes en relación a la cepa silvestre fueron 53,3% ($\Delta tlpA$), 46,7% ($\Delta SEN1977$) y 52,3% ($\Delta SEN1980$) a las 2 h, y de 19,1% ($\Delta tlpA$) y 25,2% ($\Delta SEN1977$) a las 6 h. Estos resultados sugieren que los productos codificados

por estos genes participan en procesos que favorecen la supervivencia de *S. Enteritidis* PT4 al interior de macrófagos en los tiempos estudiados.

3.3. TlpA participa en la inducción de muerte celular en macrófagos murinos J774 infectados con *S. Enteritidis* PT4.

Para determinar si los genes ensayados en la supervivencia de *S. Enteritidis* PT4 además tienen algún efecto en la viabilidad de los macrófagos infectados, se realizó un ensayo de viabilidad celular, usando un protocolo similar a los ensayos de supervivencia, en el que en vez de lisar los macrófagos se utilizó azul de Tripán para cuantificar la cantidad de macrófagos muertos por pocillo tras dos horas de infección. Se ensayaron las cepas $\Delta tlpA$ y $\Delta SEN1977$, además de la cepa silvestre. Como control se evaluaron macrófagos sin infectar.

En la **Figura 9** se muestran los resultados obtenidos para estos ensayos. En el gráfico se observa que la cepa silvestre produce muerte celular en los macrófagos infectados, efecto que se ve disminuido en la cepa mutante $\Delta tlpA$. Esto indica que TlpA tiene participación en el proceso que culmina con la muerte de estas células tras la infección. En cambio, la mutante $\Delta SEN1977$ no presenta una diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre, por lo que el producto codificado por este gen no tendría participación en estos eventos.

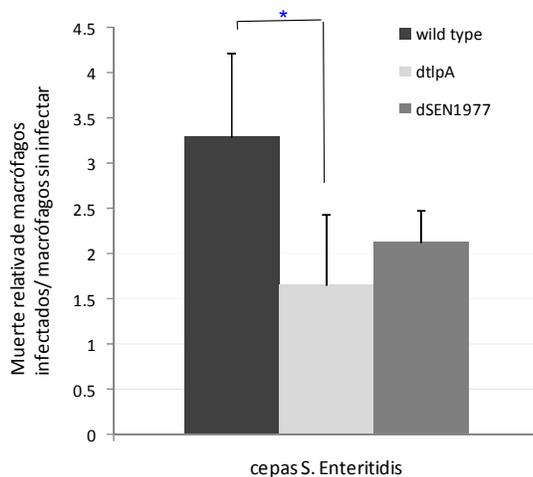


Figura 9. Ensayo de inducción de muerte de macrófagos infectados con cepas de *S. Enteritidis* PT4. Por cada cepa estudiada se realizaron tres experimentos independientes, en triplicado. Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida por cada punto. Los datos se analizaron por el test “de una vía ANOVA” y el post-test “Dunnett”. Aquellos valores que resultaron significativamente diferentes a la cepa silvestre están indicadas por asteriscos (*:p<0.05, **:p<0.01).

3.4. La proteína TlpA se produce en cultivos de *S. Enteritidis* PT4 *in vitro*.

Para determinar si *S. Enteritidis* PT4 produce la proteína TlpA *in vitro*, se fusionó el epítipo comercial 3xFlag en el extremo 3' del gen que codifica esta proteína (*SEN1975*, *tlpA*). De esta forma, la proteína recombinante TlpA3xFlag puede ser detectada por un anticuerpo específico contra este epítipo.

Para construir esta fusión en el cromosoma bacteriano se utilizó el método descrito por Uzzau y colaboradores (2001), detallado en la sección de Materiales y Métodos en el punto 2.7.1 y 2.7.2. Los clones positivos se pueden seleccionar en placas de AL suplementadas con Kan. La correcta construcción de la fusión se confirmó por PCR utilizando un partidor interno al "cassette" de resistencia a Kan (partidor K1) y uno externo que flanquea al sitio donde se realizó la fusión cromosomal (partidor TlpA-NdeI). En la **Figura 10** se muestra la fotografía de la PCR de comprobación de la cepa construida, a la que se denominó *tlpA3xFlag*.

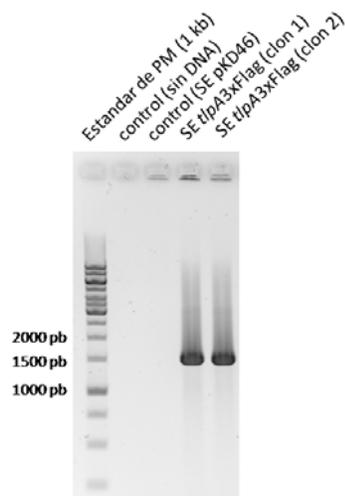


Figura 10. Productos de PCR obtenidos de los clones positivos para la fusión cromosomal *tlpA3xFlag*. A la izquierda de la imagen se describen los tamaños moleculares de las bandas del estándar de peso molecular. El producto esperado pesa 1449 pb, lo que coincide con el tamaño de la banda obtenida. En la fotografía se muestra el producto obtenido para dos clones distintos resueltos en geles de agarosa al 1%.

Las características de la secuencia aminoacídica de TlpA se muestran en la **Figura 11**. En ella se esquematizan los dominios presentes en la proteína predichos mediante un análisis bioinformático (**Figura 11A**). Se observa que el dominio TIR de TlpA se encuentra localizado en los últimos 18 kDa de la proteína, en el extremo C-terminal. El

epítotope 3xFlag se incorporó justo al final de este dominio, donde termina la secuencia que codifica para TlpA. En la **Figura 11B** se muestra la secuencia aminoacídica final de la construcción realizada, correspondiente a la fusión cromosomal *tlpA3xFlag*. La proteína recombinante consta de 315 aminoácidos totales y su peso molecular esperado es de ~36kDa.



Figura 11. Representación esquemática de la secuencia primaria de la proteína TlpA. A) Predicciones bioinformáticas de los dominios presentes en la proteína [<http://smart.embl-heidelberg.de/>]. B) Secuencia aminoacídica de TlpA3xFlag. En colores se marcan los dominios predicho en la figura A.

La cepa *tlpA3xFlag* se cultivó a 37°C en CL y también en medio mínimo N, que imita el ambiente en que se encuentra la bacteria al interior del fagosoma en macrófagos (medio pobre en magnesio y nutrientes) [Manes y cols., 2007]. Se analizó la producción de la proteína TlpA3xFlag en lisados bacterianos obtenidos de cultivos en ambas condiciones. En la **Figura 12** se observan los resultados obtenidos de los inmunoblots realizados para ambas muestras. Se detectó la producción de la proteína recombinante en ambos medios, lo que indica que en *S. Enteritidis* PT4 se induce la expresión de la proteína a 37°C tanto en CL como en medio mínimo N. El tamaño de la proteína es el esperado de acuerdo a las predicciones bioinformáticas realizadas (~36kDa).

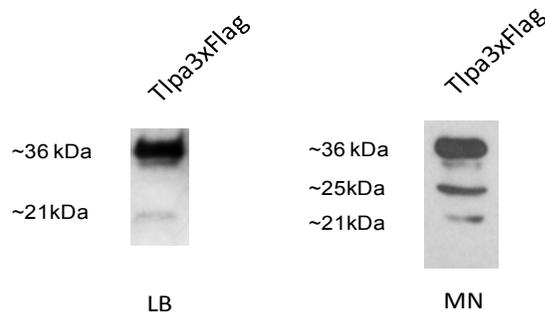


Figura 12. Análisis de la producción *in vitro* de la proteína TlpA3xFlag de *S. Enteritidis* en CL y medio mínimo N. Se observa una banda principal correspondiente al tamaño esperado para la proteína TlpA3xFlag, indicando que la proteína se produce en ambas condiciones.

Además de la banda de ~36 kDa correspondiente al tamaño esperado para la proteína TlpA3xFlag, se observan bandas de menor tamaño que pueden indicar el procesamiento o degradación de la proteína. Respecto a esto, la banda de ~21 kDa calza con el tamaño correspondiente al dominio TIR más el epítotope 3xFlag. Si la proteína es procesada, podemos detectar el fragmento C-terminal de la proteína con el anticuerpo anti 3xFlag, lo que podría explicar las bandas de menor tamaño observadas en el inmunoblot.

3.5. Los genes codificados en la isla IG-*asnT* no participan en la producción de la proteína TlpA de *S. Enteritidis* PT4.

Para determinar si los genes presentes en la isla IG-*asnT* participan en la producción de la proteína TlpA3xFlag, se construyeron cepas de *S. Enteritidis* PT4 que presentaran a la vez la fusión cromosomal *tlpA3xFlag* y una delección en la región completa de los genes de interés (*tlpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999*) o una delección puntual en los marcos de lectura de interés (*tlpA3xFlag* Δ *SEN1977*, *tlpA3xFlag* Δ *SEN1980*, *tlpA3xFlag* Δ *SEN1982*, *tlpA3xFlag* Δ *SEN1986*, *tlpA3xFlag* Δ *SEN1993* y *tlpA3xFlag* Δ *SEN1995*). Para esto, se utilizó el bacteriófago P22 HT *int* como vector para incorporar por transducción las mutaciones mencionadas sobre la cepa receptora

tIpA3xFlag. La construcción de las cepas y la comprobación de la correcta transducción de cada mutante se detallan en la sección de Materiales y Métodos (ver punto 2.7.3).

Las cepas *tIpA3xFlag*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1977*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1980*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1982*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1986*, *tIpA3xFlag* Δ *SEN1993* y *tIpA3xFlag* Δ *SEN1995* se cultivaron en CL a 37°C por toda la noche. Como control negativo se usó la cepa parental de *S. Enteritidis* PT4 que no presenta la fusión cromosomal *tIpA3xFlag*. El volumen de cultivo se ajustó por densidad óptica (OD_{600nm}) para obtener una cantidad de bacterias equivalente. Las muestras se resuspendieron en amortiguador de carga 1x (obteniéndose un lisado bacteriano) y se resolvieron en geles de SDS PAGE al 12% para ser analizados posteriormente por inmunoblot. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**. Podemos observar que la ausencia de cualquiera de los genes estudiados no afecta la producción de la proteína TIpA3xFlag, indicando que los productos génicos codificados en la isla IG-*asnT* no son indispensables para la producción de la proteína TIpA.

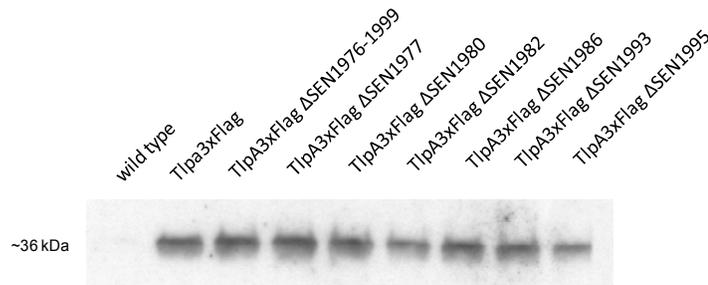


Figura 13. Análisis de la producción de la proteína TIpA3xFlag en cepas de *S. Enteritidis* crecidas en caldo Luria. Se observa una banda principal correspondiente al tamaño esperado para la proteína TIpA3xFlag tanto para la cepa que posee la fusión cromosomal *tIpA3xFlag* como para cada una de las mutantes de la isla IG-*asnT* estudiadas.

Paralelamente, se analizó la participación de los genes de la isla IG-*asnT* en la producción de la proteína TIpA al cultivar las cepas en medio mínimo N. Esta vez sólo se analizaron las cepas *tIpA3xFlag* y *tIpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999* (que posee la

delección en todos los genes de interés de la isla). En la **Figura 14** se muestra el inmunoblot realizado para estas muestras. Podemos observar que en este medio, la proteína TlpA3xFlag se produce de todas maneras en ausencia de los genes de la isla IG-*asnT* estudiados. No obstante, se ve disminuida la cantidad de proteína detectada y no se logra detectar las bandas de menor tamaño.

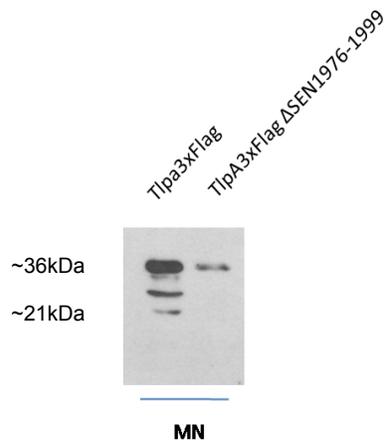


Figura 14. Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag en cepas de *S. Enteritidis* crecidas en medio mínimo N. Se observa una banda principal correspondiente al tamaño esperado para la proteína TlpA3xFlag tanto para la cepa que posee la fusión cromosomal *tlpA3xFlag* como para la cepa *tlpA3xFlag* Δ*SEN1976-1999*.

Para analizar en mayor profundidad la participación de los productos génicos codificados en la isla IG-*asnT* en la producción de la proteína TlpA, se probó lisar las bacterias mediante sonicación y no con amortiguador de carga. Este método nos permite cuantificar las proteínas y eliminar el error en la carga de los geles, así como separar la fracción citosólica de la fracción de membrana. Además de estas fracciones subcelulares se analizó el sobrenadante del cultivo (ver punto 2.9 de la sección Materiales y Métodos). Las cepas *tlpA3xFlag* y *tlpA3xFlag* Δ*SEN1976-1999* se cultivaron en CL a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se procesaron para separar el citosol de la membrana en los lisados bacterianos. Las proteínas totales presentes en cada fracción se cuantificaron por el método de Bradford. El volumen correspondiente a veinte microgramos de proteína de cada muestra se resolvió en geles SDS-PAGE al 12% y se analizaron mediante inmunoblot. En la **Figura 15** se observan los resultados obtenidos.

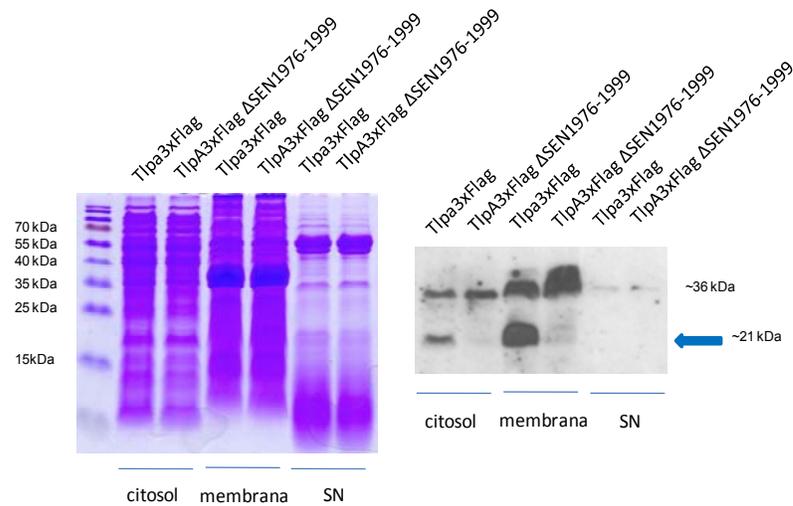


Figura 15. Análisis de la producción de la proteína TlpA3xFlag de *S. Enteritidis* en ausencia de los genes de interés de la isla IG-*asnT*. La fracción citosólica se separó de la fracción de membranas. Estas fracciones más el sobrenadante del cultivo (SN) se analizaron por inmunoblot. Se observa una banda principal (36 kDa) correspondiente al tamaño esperado para la proteína TlpA3xFlag tanto para la cepa que posee la fusión cromosomal *tlpA3xFlag* como para la cepa *tlpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999*. La cepa mutante no presenta de forma evidente la banda de menor tamaño (21kDa).

Podemos observar que TlpA se encuentra presente en la fracción citosólica y también en la fracción de membrana. En el sobrenadante de cultivo la proteína TlpA es casi indetectable, lo que nos sugiere que esta proteína no es secretada al medio extracelular en CL a 37°C. Tanto en las muestras de la cepa *tlpA3xFlag* como de *tlpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999* se detecta la banda de ~36 kDa correspondiente a TlpA en las fracciones citosólicas y en las de membrana. Por otra parte, en las muestras de citosol y de membrana de la cepa *tlpA3xFlag* Δ *SEN1976-1999*, la banda de ~21 kDa se detecta tenuemente en comparación con la cepa *tlpA3xFlag*. Estos resultados confirman que los productos codificados en la isla IG-*asnT* estudiados no son requeridos para que se produzca la proteína TlpA y sugieren que alguno de los genes presentes en la isla IG-*asnT* podría participar en su procesamiento.

3.6. Los genes codificados en la isla IG-*asnT* no participan en la regulación de la expresión del gen *tIpA* en *S. Enteritidis* PT4.

Para determinar si alguno de los genes presentes en la isla IG-*asnT* tiene participación en la expresión del gen *tIpA*, realizamos una fusión transcripcional del promotor del gen *tIpA* con el operón *lac*, sin su promotor, mediante el método descrito por Ellermeier y cols. (2002). De esta forma se puede cuantificar la expresión del gen *tIpA* midiendo la actividad de la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*. Ya que algunos marcos de lectura presentes en la isla IG-*asnT* codifican proteínas con homología a factores transcripcionales (*SEN1993* y *SEN1998*), se construyó una cepa que contenía la fusión *tIpA-lacZ* y una delección que incluye los genes de interés de la isla IG-*asnT* (PT4 *tIpA-lacZ* Δ *SEN1976-1999*, ver sección de Materiales y Métodos, punto 2.10). La actividad β -galactosidasa de ambas cepas en CL a 37°C se cuantificó a distintas etapas del crecimiento bacteriano en el cultivo. Los resultados se muestran en la **Figura 16**.

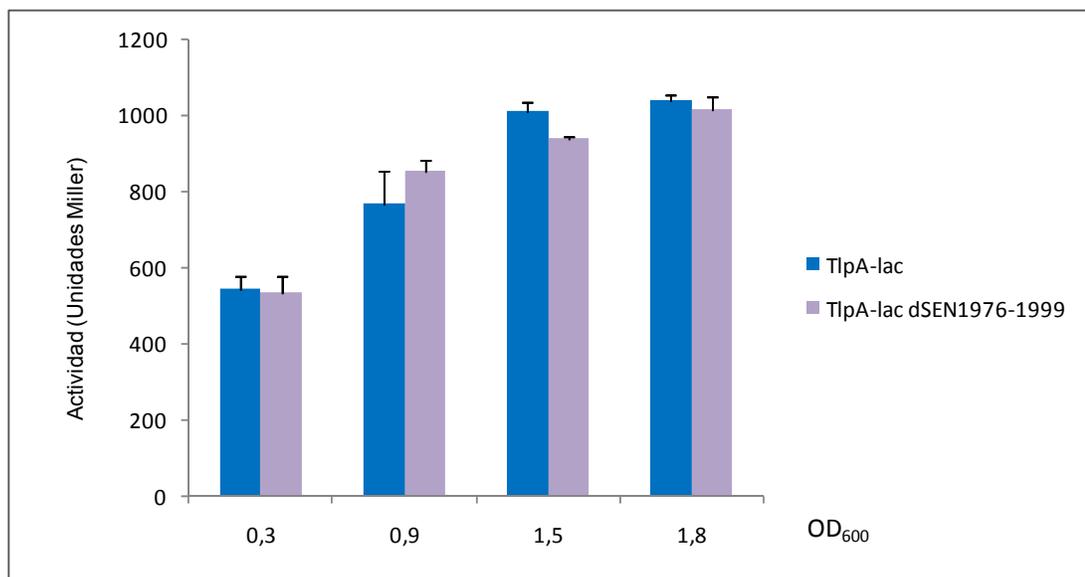


Figura 16. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa de las cepas con fusión *tIpA-lacZ* en presencia y ausencia de los genes de interés de la isla IG-*asnT*. La actividad enzimática se midió en las cepas PT4 *tIpA-lacZ* y PT4 *tIpA-lacZ* Δ *SEN1976-1999* obtenidas desde distintas etapas del crecimiento bacteriano en cultivos de CL a 37°C.

En la **Figura 16** se observa que el gen *tIpA* se expresa durante todas las fases del crecimiento en las condiciones estudiadas, siendo mayor su expresión en fase estacionaria. La expresión del gen *tIpA* es la misma tanto en la cepa *tIpA-lacZ* como en la cepa *tIpA-lacZ* Δ *SEN1976-1999*, lo que nos indica que los genes pertenecientes a la isla IG-*asnT* no participan en regular la expresión de TIpA en las condiciones estudiadas.

3.7. La proteína TIpA no es secretada al medio extracelular en cultivos estándar *in vitro*.

Ya que la proteína TIpA3xFlag de origen cromosomal se produce en bajas cantidades, se generó un plasmidio (pTIpA3xFlag) con un promotor inducible por ramnosa fusionado al gen *tIpA3xFlag*, con el fin de obtener cantidades abundantes de la proteína TIpA3xFlag en cada fracción analizada agregando una concentración óptima de ramnosa al medio. Esto se hizo para comprobar si la proteína se puede detectar en el sobrenadante de cultivo y determinar si efectivamente TIpA no es secretada en CL. La cepa silvestre de *S. Enteritidis* PT4 y la cepa Δ *SEN1976-1999* se transformaron con el plasmidio pTIpA3xFlag. Como controles se usó la cepa silvestre (sin plasmidio) y la cepa transformada sin inducir (PT4 pTIpA3xFlag sin ramnosa en el cultivo). Las cepas se crecieron en CL a 37°C hasta una OD₆₀₀ de 0,6 y luego se indujeron con ramnosa 0,1% por 1 h. Se analizó el lisado bacteriano, la fracción citosólica, la fracción de membrana y el sobrenadante de cultivo. Muestras con veinte microgramos de proteína de cada fracción se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 12% y se analizaron mediante inmunoblot. Cada muestra se resolvió en un gel en paralelo para la tinción de proteínas con azul de Coomassie. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**.

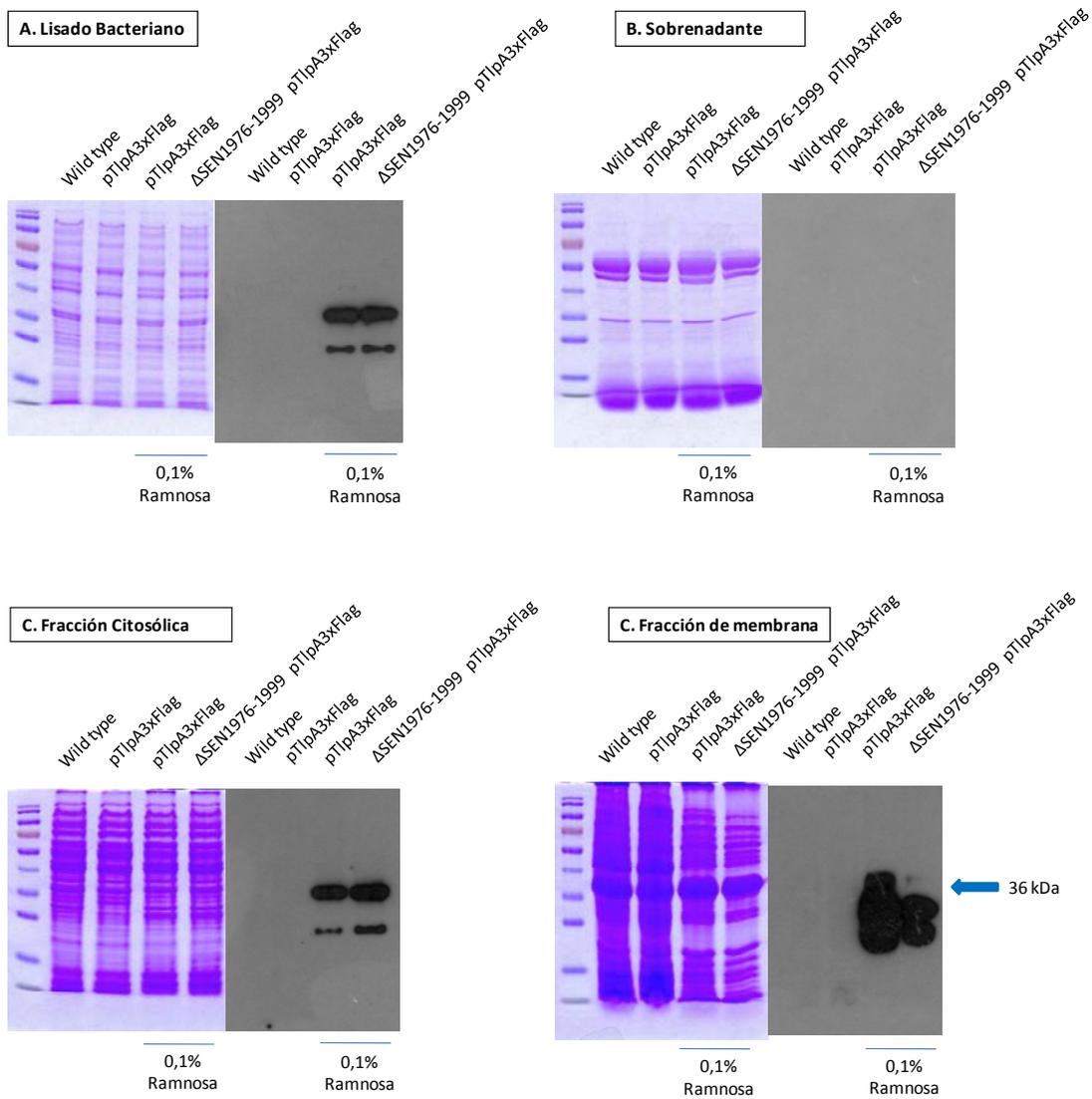


Figura 17. Análisis de la producción y secreción de la proteína TlpA3xFlag expresada a partir de un plasmidio inducible por ramnosa. Se analizó la cepa silvestre y la cepa $\Delta SEN1976-1999$. Como control se utilizaron la cepa silvestre y la cepa transformada con el plasmidio pTlpA3xFlag sin inducción. Las muestras de los lisados bacterianos (A), el sobrenadante de cultivo (B), la fracción citosólica (C) y la fracción de membrana (D) se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La proteína TlpA3xFlag se detectó por inmunoblot con anticuerpos monoclonales contra el epítipo 3xFlag.

En la **Figura 17A** se observa que tanto la cepa silvestre como la cepa $\Delta SEN1976-1999$ transformadas con el plasmidio pTlpA3xFlag producen la proteína TlpA3xFlag, confirmándose que los genes presentes en la isla IG-*asnT* estudiados no participan en la producción de esta proteína. A diferencia de lo observado en las cepas con la fusión cromosomal *tlpa3xFlag*, la cepa $\Delta SEN1976-1999$ transformada con el plasmidio pTlpA3xFlag también produce un fragmento de menor tamaño (~21 kDa), tanto en la fracción citosólica (**Figura 17C**) como en la de membrana (**Figura 17D**). Se confirma además que la proteína TlpA3xFlag no se secreta al medio de cultivo en las condiciones analizadas (**Figura 17B**).

3.8. La proteína TlpA se expresa al interior de bacterias recuperadas desde macrófagos J774 infectados.

Para determinar si la proteína TlpA se expresa y se secreta al interior de macrófagos *in vitro*, se diseñó una estrategia que permitiera comprobar que la presencia de la proteína TlpA en el lisado de macrófagos infectados se debiera a que la proteína se exporta desde la bacteria y no a lisis celular. Para esto, se utilizó una cepa de *S. Enteritidis* que posee en su cromosoma el alelo *cat3xFlag*, que expresa constitutivamente la enzima cloranfenicol acetiltransferasa fusionada al epítipo comercial 3xFlag (CAT3xFlag). La cloranfenicol acetiltransferasa confiere resistencia a cloranfenicol, y se encuentra exclusivamente en el citosol bacteriano. Además, posee un peso molecular diferente al de TlpA3xFlag (~30 kDa), lo que permite distinguirlas al ser detectadas simultáneamente con el anticuerpo monoclonal anti-3xFlag. La cepa se transformó con el plasmidio pTlpA3xFlag. De esta forma, se espera que si TlpA se secreta en macrófagos se detecte en el lisado de macrófagos sólo la banda correspondiente a TlpA3xFlag no a la CAT3xFlag.

Se determinó la cantidad óptima de ramnosa agregada al medio de cultivo para ver la banda de TlpA3xFlag en cantidades similares a la banda de CAT3xFlag. En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos para un inmunoblot realizado a un lisado bacteriano de esta cepa cultivada en CL hasta una OD_{600} de 0,6 e inducida con

distintas cantidades de ramnosa por 1 h. La inducción con 0,1% de ramnosa es una concentración apropiada para el estudio de las fracciones subcelulares. Al exponer el film por un tiempo más prolongado, se confirma que los fragmentos de ~36 kDa y ~21 kDa corresponden a la proteína TlpA3xFlag, ya que ambas son inducidas por ramnosa.

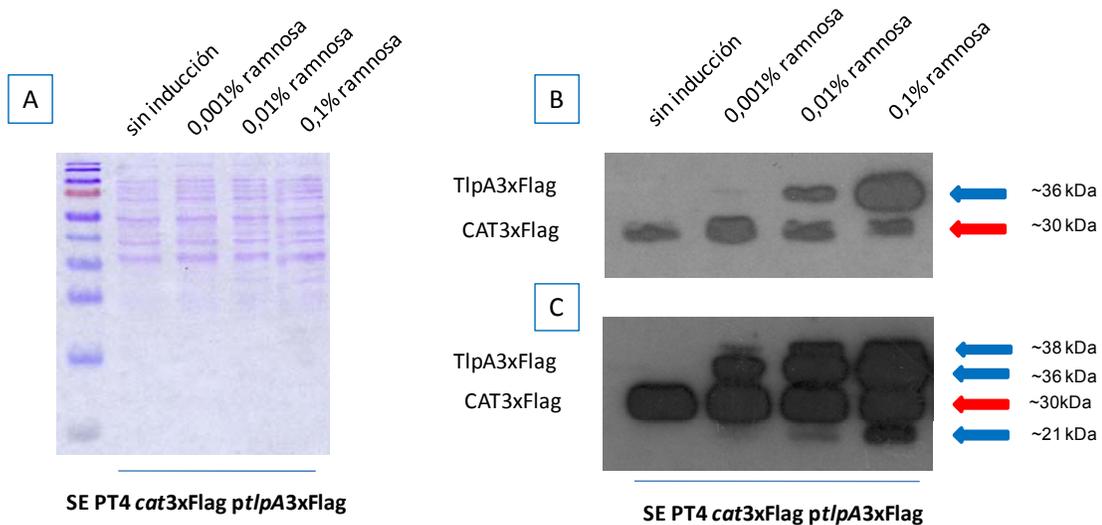


Figura 18. Curva de inducción de TlpA3xFlag con concentraciones crecientes de ramnosa (0,001%-0,1%) en la cepa que expresa la proteína CAT3xFlag como control interno y transformada con el plasmidio pTlpA3xFlag. A) Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. B) Inmunoblot de las muestras analizadas. Exposición del film por 5 min. C) Inmunoblot de las muestras analizadas. Exposición del film 15 min. Se observan las bandas correspondientes a TlpA3xFlag (~36 kDa y ~21kDa) y a CAT3xFlag (~ 30 kDa).

Posteriormente, se realizó un ensayo de infección de macrófagos murinos similar al ensayo de supervivencia intracelular *in vitro* (ver sección de Materiales y Métodos, punto 2.11.4), pero usando una cantidad mayor de macrófagos ($1,5 \times 10^6$ células por pocillo) y una MOI de 100 para aumentar la cantidad de proteína recuperada tanto de las bacterias internalizadas como del lisado de macrófago. Los resultados de las muestras obtenidas a partir de las bacterias inoculadas, las bacterias recuperadas desde el interior de los macrófagos tras dos horas de infección y del lisado de los macrófagos a este tiempo se muestran en la **Figura 19**.

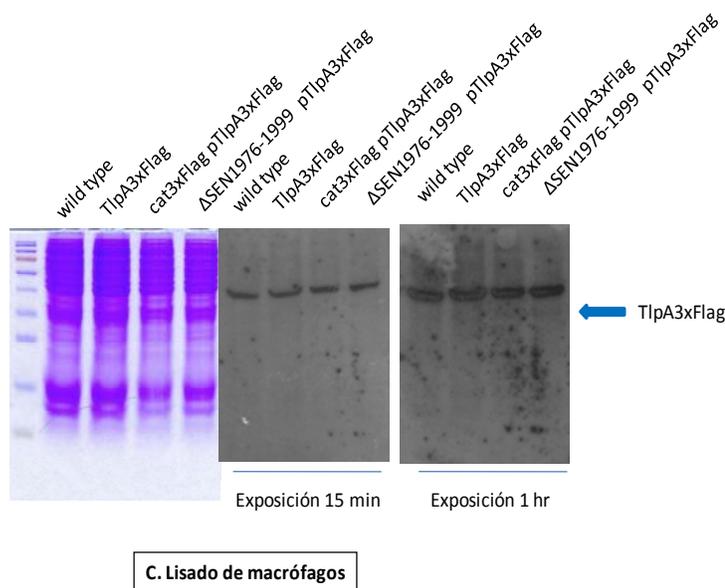
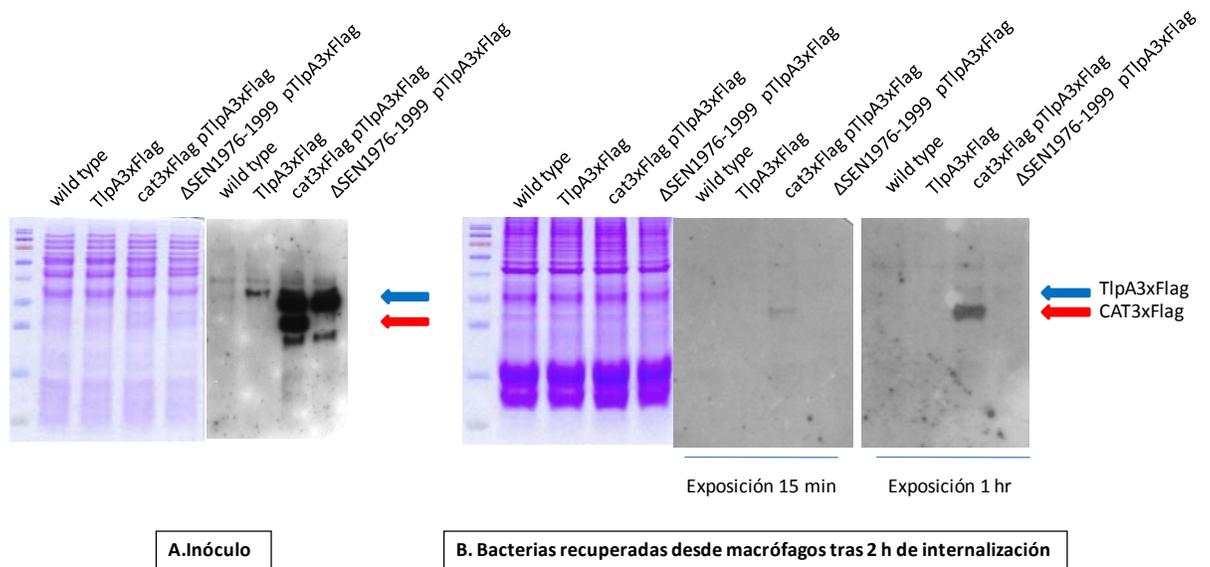


Figura 19. Análisis de la producción y secreción *in vitro* de la proteína TlpA3xFlag de *S. Enteritidis* en macrófagos. Se realizó un ensayo de infección de macrófagos murinos J774 con las cepas PT4 *tlpA3xFlag* (fusión cromosomal), PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag y PT4 Δ SEN1976-1999 pTlpA3xFlag. Las muestras de proteína obtenidas a partir de las bacterias inoculadas (A), las bacterias recuperadas desde los macrófagos infectados (B) y el lisado de macrófagos (C) se analizaron por inmunoblot.

En la **Figura 19A** se muestra el inmunoblot realizado para las muestras de las cepas bacterianas PT4 *tlpA3xFlag* (fusión cromosomal), PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag y PT4 Δ SEN1976-1999 pTlpA3xFlag que se analizaron. Como control negativo de la detección de TlpA3xFlag se usó la cepa silvestre sin la fusión cromosomal. Se observa que las cepas inoculadas expresan la proteína TlpA, destacando que para la cepa PT4

cat3xFlag pTlpA3xFlag se detectan tanto TlpA3xFlag como CAT3xFlag con intensidades similares.

En la **Figura 19B** se observa el análisis de las muestras de las bacterias recuperadas desde el interior de macrófagos tras dos horas de infección. En este caso, la banda de ~36 kDa y la de ~21 kDa de TlpA3xFlag son casi indetectables, tanto en la cepa que expresa TlpA3xFlag desde el gen cromosomal como en la expresada desde el plasmidio inducible. A diferencia de la proteína de TlpA3xFlag, en la muestra de la cepa PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag se puede detectar una banda intensa correspondiente a CAT3xFlag. Estos resultados sugieren que la proteína TlpA3xFlag está siendo (i) exportada desde la bacteria hacia el citosol de los macrófagos, (ii) degradada o (iii) dejando de ser producida en estas condiciones.

Lamentablemente, en las muestras obtenidas a partir de los lisados de macrófagos infectados (**Figura 19C**) sólo se observa una banda inespecífica de gran intensidad. Debido a esto, no es posible determinar si la desaparición de las bandas de TlpA en las muestras de bacterias recuperadas desde el interior de macrófagos tras dos horas de infección se debe a la exportación de TlpA a la célula hospedera.

Para determinar si la proteína TlpA efectivamente se produce en las bacterias que son internalizadas en los macrófagos, el mismo experimento se realizó usando una MOI de 200, para aumentar las bacterias recuperadas e incrementar la posibilidad de detectar TlpA en las muestras analizadas. En la **Figura 20** se muestran los resultados obtenidos.

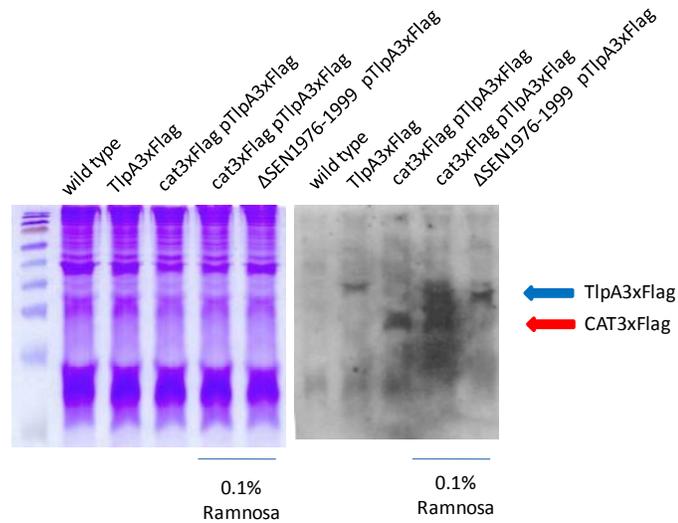


Figura 20. Análisis de la producción de la proteína TlpA-3xFlag de *S. Enteritidis* en bacterias internalizadas en macrófagos murinos *in vitro*. Se realizó un ensayo de infección de macrófagos murinos J774 con las cepas PT4 *tlpA3xFlag* (fusión cromosomal), PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag y PT4 Δ *SEN1976-1999* pTlpA3xFlag. Las bacterias recuperadas desde los macrófagos infectados se analizaron por inmunoblot.

En la **Figura 20** se observa la banda correspondiente a TlpA3xFlag en la cepa que tiene la fusión cromosomal *tlpA3xFlag*. Esto nos indica que la bacteria en condiciones naturales expresa la proteína TlpA al interior de los macrófagos infectados. En las cepas transformadas con el plasmidio pTlpA3xFlag (PT4 *cat3xFlag* pTlpA3xFlag y PT4 Δ *SEN1976-1999* pTlpA3xFlag) también se detecta la banda correspondiente a TlpA3xFlag, indicando que los genes de la isla IG-*asnT* estudiados (*SEN1976* al *SEN1999*) no participan en la producción de TlpA al interior de los macrófagos.

4. DISCUSIÓN

Hoy en día, la salmonelosis es la principal causa de infecciones asociadas a alimentos y constituye un problema global de salud pública. Pese a que es una enfermedad que ha perdurado desde el siglo XX, los serovares de *Salmonella* que han sido prevalentes a lo largo de los años han ido variando. Durante varias décadas, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* fueron los serovares predominantemente aislados dentro de la población, los que han sido reemplazados desde los años '90 por un nuevo serovar que actualmente es el más prevalente a nivel mundial: *S. Enteritidis* [Fica y cols., 2001; Guard-Petter, 2001]. A diferencia de *S. Typhi*, que es un patógeno exclusivo de seres humanos, *S. Enteritidis* tiene la capacidad de infectar distintos hospederos, que incluyen roedores, aves y el hombre. Esto produce que las infecciones causadas por este serovar, además del riesgo que genera en la población, produzca un impacto económico en la producción animal. Por otra parte, esta característica facilita la diseminación de la bacteria y ha contribuido a su carácter pandémico.

Los serovares de *Salmonella* comparten cerca del 80% de su contenido genético [Bäumler y cols., 1998, Wain y cols., 2001], en el que se encuentran las regiones genómicas que se han descrito como Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs), que codifican los factores de virulencia que participan en los mecanismos generales de patogenicidad de esta bacteria. En las secuencias únicas de cada serovar se encontrarían los genes que dan cuenta de las diferencias entre los distintos serovares en su especificidad de hospedero y virulencia. Debido a esto, nuestra investigación se ha enfocado en caracterizar regiones genómicas que diferencien a *S. Enteritidis* de otros serovares frecuentemente aislados en la población, con el objetivo de identificar mecanismos moleculares particulares de este serovar que contribuyan a su virulencia.

En este trabajo se estudió una isla genómica, a la que denominamos IG-*asnT* por estar inserta en el gen que codifica para el tRNA de asparragina T (*asnT*) en *S. Enteritidis*. Recientemente, esta región genómica se denominó como ROD-21 (*Region of Difference 21*) en un análisis genómico comparativo que definió esta isla como una de

las regiones de variabilidad que diferencia los genomas de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Typhimurium* [Thomson y cols., 2008]. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que varios de los marcos de lectura presentes en IG-*asnT* son requeridos para la colonización de bazo en ratones BALB-c inoculados con una dosis intraperitoneal de *S. Enteritidis* [Silva, 2009]. La principal vía de colonización sistémica de *Salmonella* es la utilización de células del sistema inmune innato (fagocíticas) como vectores para alcanzar los órganos internos. [Kuhle y cols., 2004]. Por lo tanto, nuestra primera aproximación para analizar la función de los genes presentes en IG-*asnT* fue evaluar si la ausencia de alguno o todos los genes de esta región produce una deficiencia en la bacteria en su capacidad de sobrevivir al interior de macrófagos murinos. Para esto, se diseñó un ensayo de supervivencia intracelular basado en el descrito por Schwan y cols. (2000), que permite recuperar las bacterias que son capaces de infectar macrófagos y sobrevivir al interior de estos. Las cepas analizadas fueron: $\Delta tlpA$ (gen con homología a dominios TIR), $\Delta SEN1977$ (que presenta homología a subunidades estructurales de un pili tipo IV), $\Delta SEN1980$ (que presenta en su secuencia dominios involucrados en transferencia de plasmidios), $\Delta SEN1976-1999$ (con una delección en los genes de interés de la isla) y también la cepa $\Delta SEN1971-1999$ (con una delección que comprende casi la totalidad de la isla IG-*asnT*).

Contrariamente a lo esperado, la cepa silvestre (*S. Enteritidis* PT4) no prolifera de forma eficiente al interior de los macrófagos J774 *in vitro*. La curva de supervivencia intracelular obtenida para esta cepa es descendente. Es decir, tras seis horas de infección se recuperan menos bacterias que a las dos horas (**Figura 6**). Esto implica que una cantidad muy reducida de bacterias se puede recuperar a tiempos más prolongados de infección. Debido a esto, se estudiaron las diferencias entre las cepas mutantes y la cepa silvestre sólo tras dos y seis horas de internalización.

Nuestros resultados indican que las mutantes con delecciones en marcos de lectura puntuales ($\Delta tlpA$, $\Delta SEN1977$ y $\Delta SEN1980$) presentan una deficiencia en su capacidad de sobrevivir al interior de macrófagos murinos J774 en comparación a la cepa silvestre tras dos horas de infección (**Figura 8**). Curiosamente, las mutantes con delecciones en regiones que comprenden varios genes de la isla no presentan una

diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre. Esto implica que la ausencia de varios genes dentro de la isla a la vez tiene un menor impacto en la capacidad de sobrevivir al interior de los macrófagos que la ausencia de cada gen puntual ensayado. Esto podría deberse a que algunos de los genes dentro de la isla (muchos de los cuales no tienen una función conocida), pueden modular el efecto producido por los genes estudiados, neutralizando la acción producida en la célula hospedera. Por otra parte, si los genes presentes en IG-*asnT* codifican proteínas que constituyen un organelo en la membrana, es probable que la ausencia de uno de los componentes afecte de forma más negativa el *fitness* de la bacteria al interior del macrófago que la ausencia del organelo completo.

Tras seis horas de infección sólo las mutantes $\Delta tlpA$ y $\Delta SEN1977$ mostraron tener una deficiencia en la supervivencia en los macrófagos. Para la mutante $\Delta SEN1980$, a las 6 horas de infección la cantidad de bacterias recuperadas es casi equivalente a las recuperadas de la cepa silvestre. Esto sugiere que el producto génico codificado por este marco de lectura participaría en etapas tempranas de la infección al macrófago, mientras que TlpA y la proteína estructural del pilus tipo IV (hipotética) codificada por el marco de lectura *SEN1977* tienen mayor contribución a la capacidad de la bacteria de sobrevivir al interior de los macrófagos o una participación constante durante el proceso en los tiempos estudiados.

Con respecto a la función que puede estar cumpliendo la proteína codificada por el marco de lectura *SEN1977*, se ha descrito que las proteínas que forman parte de un pilus tipo IV son factores de virulencia que pueden participar en motilidad, adhesión o secreción de proteínas efectoras [Craig y cols., 2008].

El marco de lectura *SEN1980* posee un dominio perteneciente a la familia MobA/MobL, el cual está presente en proteínas que participan en transferencia de plasmidios [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>]. El dominio presente en esta proteína es característico de las relaxasas que cortan el DNA para desenrollarlo durante la conjugación. La forma en que una proteína como esta puede estar involucrada en procesos de infección se relaciona con los sistemas de secreción tipo IV [Cascales y

cols., 2003]. Estos sistemas evolucionaron a partir de las maquinarias de conjugación y pueden participar en transferencia de plasmidios, captura y liberación de DNA o traslocación de efectores que son indispensables para procesos de infección en patógenos de plantas y mamíferos. El sistema de secreción tipo IV requiere de un pilus que permita la traslocación del DNA o del efector exportado a la célula hospedera. Es atractivo pensar que los genes estudiados de la isla IG-*asnT* puedan ser parte de un sistema de secreción de este tipo, siendo la proteína codificada por *SEN 1977* parte estructural del pilus y TlpA uno de los efectores del sistema. Sin embargo, las proteínas codificadas en IG-*asnT* no presentan homología con los genes que se han descrito como parte de un sistema de secreción tipo IV en otras bacterias Gram-negativo, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori* o *Brucella* spp. Por otra parte, la organización genética de IG-*asnT* es conservada en una isla genómica presente en cepas de *Escherichia coli* uropatogénica (*E. coli* 536, *E. coli* CFT073) donde se encuentra un homólogo de TlpA (TcpC), el cual es exportado y capturado por macrófagos *in vitro* [Cirl y cols., 2008]. La función de los genes de esta isla genómica en *E. coli* no ha sido estudiada aún. Es probable que la función que cumplan los genes de IG-*asnT* esté relacionada con un sistema de secreción, sin embargo, no es posible determinarlo con las evidencias experimentales existentes.

Como era esperado, la mutante en el gen *tlpA* presentó deficiencias en la supervivencia al interior de macrófagos murinos en comparación a la cepa silvestre. Este fenotipo había sido observado en otra cepa de *S. Enteritidis* (LK5) en ensayos de supervivencia intracelular en macrófagos humanos *in vitro* [Newman y cols., 2006]. Se ha postulado que TlpA interfiere con la cascada de señales que conduce a la activación de NF-kB mediante proteínas que poseen dominios TIR, secuestrándolas e impidiendo que se produzca la transcripción de genes involucrados con el montaje de una respuesta inflamatoria. De esta forma, TlpA contribuiría a que *S. Enteritidis* evada la respuesta inmune que se activa al entrar en contacto los macrófagos con la bacteria, lo que favorece la supervivencia del patógeno al interior de estas células.

Además, dentro de los experimentos realizados en la presente tesis, pudimos evidenciar que existe una diferencia en el efecto producido en la viabilidad de los

macrófagos infectados al comparar la cepa silvestre y la cepa $\Delta tlpA$. La infección con la cepa silvestre induce una muerte celular mayor a la observada cuando los macrófagos se infectan con la cepa $\Delta tlpA$ (**Figura 9**). Esto implica que TlpA cumple algún papel en la interacción con los macrófagos que reduce su viabilidad durante la infección. Con respecto a esto, en el mismo trabajo realizado por Newman y cols. (2006) se evidenció que TlpA es capaz de inducir la secreción de IL-1 β por mecanismos que involucran la activación de la caspasa-1. Esta caspasa está involucrada en un mecanismo de muerte celular programado denominado piroptosis, que a diferencia de la apoptosis es un proceso proinflamatorio [Fink y cols., 2005]. La activación de la caspasa 1 en los macrófagos infectados con *Salmonella* o *Shigella* resulta en el procesamiento de las citoquinas IL-1 β e IL-18 a sus formas activas, lo que conduce a la muerte de la célula hospedera. Se ha descrito que las proteínas IpaB en *Shigella* y SipB en *Salmonella*, ambos efectores del SSTT codificados en la SPI-1, son capaces de inducir piroptosis en los macrófagos que infectan [Hersh y cols., 1999]. Es probable que el efecto de TlpA sobre la viabilidad de los macrófagos infectados se explique por esta vía de muerte programada. A diferencia de TlpA, la supuesta pilina codificada por el marco de lectura *SEN1977* no tiene un efecto significativo en la viabilidad de los macrófagos.

Para determinar si la proteína TlpA es producida por *S. Enteritidis* PT4, evaluar las condiciones en que es producida y la participación de los genes de la isla IG-*asnT* en su supuesta producción y secreción, se diseñó una estrategia para poder detectar la proteína mediante inmunoblot, fusionando el gen *tlpA* con un epítotope comercial (3xFlag) para el cual existen anticuerpos monoclonales disponibles. La fusión del epítotope 3xFlag se realizó en el extremo 3' del gen *tlpA*, ya que el dominio TIR involucrado en la transducción de señales de proteínas que median respuestas inmunológicas se encuentra codificado en el extremo carboxilo terminal de TlpA (**Figura 11**). De esta forma, si existe un procesamiento de la proteína seríamos capaces de detectar el fragmento que contiene el dominio de interés.

Nuestros resultados indican que la proteína TlpA es producida en CL y en medio mínimo N a 37°C (**Figura 12**). Además de la banda principal, correspondiente a la proteína TlpA completa (~36 kDa), se obtuvo una banda de menor tamaño (~21 kDa)

que se detecta constantemente al sobreexponer el film del inmunoblot y que corresponde al tamaño del dominio TIR con el epítipo 3xFlag. Esto nos llevó a pensar que es probable que exista un procesamiento de la proteína TlpA en las condiciones estudiadas. Esta banda podría corresponder también a una proteína que se expresa de forma independiente a la proteína TlpA completa, debido a la presencia de algún promotor interno en la secuencia del gen *tlpA*. También podría ser un producto de la degradación de la proteína. No corresponde a una banda inespecífica, ya que al clonar la fusión *tlpA3xFlag* en un vector inducible por ramnosa, tanto la banda de ~36 kDa como la de ~21 kDa son inducidas al agregar ramnosa al medio (**Figura 17**).

Al analizar la producción de TlpA en las cepas que tienen una delección en genes puntuales de la isla IG-*asnT* o una delección que comprende todos los genes de interés pudimos observar que la ausencia de cualquiera de los genes no afecta la capacidad de la bacteria de producir esta proteína (**Figura 14, Figura 15, Figura 17**). Por lo tanto, los genes estudiados de la isla IG-*asnT* no participan en la producción de TlpA. Pese a esto, la ausencia de los genes de la isla IG-*asnT* parece afectar el supuesto procesamiento de TlpA cuando se expresa desde el cromosoma bacteriano (**Figura 15**), ya que la banda de ~21 kDa es casi indetectable en la cepa *tlpA3xFlag* Δ SEN1976-1999. Es necesario realizar experimentos adicionales para comprobar la hipótesis del procesamiento y de la participación de los genes estudiados en este proceso. Por ejemplo, fusionar un epítipo 3xFlag en el extremo N-terminal de TlpA para detectar el otro segmento y verificar que los tamaños de las bandas concuerdan con el tamaño total de TlpA. Esto descartaría que se exprese otra proteína interna a partir del gen *tlpA* que de origen a la banda de menor tamaño.

Para evaluar la expresión del gen *tlpA* en las distintas etapas del crecimiento de *S. Enteritidis* PT4, realizamos fusiones transcripcionales de β -galactosidasa con el promotor de *tlpA* (*tlpA-lacZ*) y se determinó su actividad en distintas fases de crecimiento en CL a 37°C. En la **Figura 16** se observa que el gen *tlpA* se expresa en todas las etapas del crecimiento en estas condiciones, aumentando su transcripción a medida que se va alcanzando la fase estacionaria. La disminución de los nutrientes y la acidificación del pH en fase estacionaria imitan en parte el ambiente en el que se

encuentra la bacteria al interior de los macrófagos, señales que podrían estar induciendo la expresión de TlpA.

Además, ya que existen genes con homología a factores transcripcionales dentro de la isla IG-*asnT* (*SEN1993*, *SEN1998*) y otros sin homología a proteínas con función conocida, construimos una cepa que, además de poseer la fusión de β -galactosidasa con el promotor de *tlpA*, presentara una delección en los genes de interés de IG-*asnT* (*tlpA-lacZ* Δ *SEN1976-1999*). Esto con la finalidad de determinar si alguno de los genes presentes en la isla participa en regular la expresión de *tlpA*. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de los genes de la isla IG-*asnT* no influye en la expresión de del gen *tlpA* en las condiciones estudiadas (CL a 37°C), ya que los niveles de expresión se mantienen en todas las fases de crecimiento al comparar la cepa *tlpA-lacZ* y la cepa *tlpA-lacZ* Δ *SEN1976-1999* (**Figura 16**). Análisis bioinformáticos adicionales [http://www.prodoric.com/vfp/vfp_promoter.php] indican que la región promotora de *tlpA* podría incluir secuencias de unión para los factores transcripcionales OxyR, OmpR y AraC, todos ellos descritos en la literatura como factores necesarios para la supervivencia de patógenos Gram-negativo al interior de macrófagos [Halsey y cols., 2004; Fass y cols., 2009; Coburn y cols., 2008].

Respecto a la localización de la proteína TlpA en *S. Enteritidis*, pudimos detectar su presencia tanto en la fracción citosólica como en la fracción de membrana de las muestras analizadas, no así en el sobrenadante de cultivo, lo que nos indica que esta proteína no es secretada al medio extracelular en CL a 37°C (**Figura 15** y **Figura 17**). Es probable que las señales que producen su exportación sean las que encuentra al entrar en contacto con los macrófagos o al interior de la vacuola fagocítica. En relación a esto, pudimos observar que en las bacterias recuperadas desde el interior de los macrófagos tras dos horas de internalización la proteína TlpA es casi indetectable, presentándose en una relación distinta con respecto al control interno (CAT3xFlag) en comparación a las muestras de las bacterias inoculadas (**Figura 19B**). Una de las hipótesis que surge con esto es que la proteína está siendo exportada hacia la célula hospedera, donde ésta ejerce su función. Pudimos demostrar que efectivamente TlpA se produce al interior de los macrófagos infectados y que la ausencia de la región que

comprende los marcos de lectura *SEN1976* al *SEN 1999* no afectan esta producción (**Figura 20**). Lamentablemente, con la estrategia experimental utilizada no fue posible detectar la proteína TlpA en el lisado de macrófagos infectados (**Figura 19C**). La cantidad de TlpA presente en las células hospederas puede ser muy baja como para detectarla mediante inmunoblot. Una mejor aproximación sería utilizar anticuerpos con marcas fluorescentes para localizar la proteína mediante inmunofluorescencia, técnica que otorga una mayor sensibilidad y permitiría evidenciar directamente de la presencia de la proteína en las células hospederas.

Los resultados de esta tesis entregan nueva evidencia sobre factores de virulencia de *S. Enteritidis*, que en parte pueden explicar las ventajas adaptativas que presenta esta cepa en relación a otros serovares de *Salmonella* en su capacidad de enfrentarse con células de defensa de su hospedero. Por otra parte, se generaron cepas de *S. Enteritidis* que presentan atenuación en su virulencia, las que pueden ser probadas en modelos *in vivo* como posibles vacunas para controlar este patógeno.

5. CONCLUSIONES

1. La isla genómica IG-*asnT* corresponde a una isla de patogenicidad de *S. Enteritidis*.
2. Los genes *tIpA* y Δ SEN1977 presentes en IG-*asnT* son necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Enteritidis* en macrófagos murinos durante las primeras horas de infección.
3. TIpA afecta la viabilidad celular de macrófagos murinos infectados.
4. TIpA se produce en condiciones estándar de cultivo, encontrándose en las fracciones citosólicas y de membrana.
5. Esta proteína no es secretada al medio de cultivo en caldo Luria a 37°C.
6. Los genes pertenecientes a la isla genómica IG-*asnT* no se requieren para la producción la proteína TIpA en caldo Luria a 37°C.
7. TIpA se expresa en las bacterias recuperadas desde macrófagos murinos J774 infectados con *S. Enteritidis* PT4. Con la metodología utilizada no fue posible determinar si la proteína es exportada desde la bacteria al macrófago.

BIBLIOGRAFÍA

Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lilehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA. (2004) *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Veter Immunol Immunopathol.* 101: 251-257.

Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 66: 4579-4587.

Betancor L, Schelotto F, Fernandez M, Pereira M, Rial A, Chabalgoity JA. (2005) An attenuated *Salmonella* Enteritidis strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. *Vet Microbiol.* 107(1-2):81-9.

Blanc-Potard AB, Groisman EA. (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 16(17):5376-85.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R y Swaminathan B. (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 38(7), 2465-7.

Cardona ST, Valvano MA. (2005) An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid.* 54(3):219-28.

Cascales E, Christie PJ. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* 1(2):137-49.

Cerquetti MC, Gherardi MM. (2000) Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol.* 76(2):185-92.

Cirl C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fischer H, Stappert D, Wantia N, Rodriguez N, Wagner H, Svanborg C, Miethke T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med.* 14(4):399-406.

Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT, Shankar N. (2008) An AraC-type transcriptional regulator encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island contributes to pathogenesis and intracellular macrophage survival. *Infect Immun.* 76(12):5668-76.

Craig L, Li J. (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol.* 18(2):267-77.

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(12):6640-5.

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):153-61.

Fass E, Groisman EA. (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 12(2):199-204.

Fernandez J, Fica A, Ebensperger G, Calfullan H, Prat S, Fernandez A, Alexandre M, Heitmann I. (2003) Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. *J Clin Microbiol.* 41(4):1617-22.

Fica A, Alexandre M, Prat S, Fernández A, Fernández O, Heitmann I. (2001) Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile: desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Rev. chil. Infectol.* 18(2):85-93.

Fink SL, Cookson BT. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.*73(4):1907-16.

Galán JE. (1999) Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol.* 2(1):46-50.

Guard-Petter, J. (2001) The chicken, the egg and *Salmonella Enteritidis*. *Environ Microbiol* 3(7):421-430.

Hacker J, Carniel E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports.* 2(5):376-81.

Halsey TA, Vazquez-Torres A, Gravdahl DJ, Fang FC, Libby SJ. (2004) The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infect Immun.* 72(2):1155-8.

Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(5):2396-401.

Kiss T, Morgan E, Nagy G. (2007) Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett.* 275(1):153-9.

Kuhle V, Hensel M. (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci.* 61(22):2812-26.

Leung KY, Finlay BB. (1991) Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(24):11470-4.

Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC. (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* 2(8):e81.

Maloy SR, Stewart VJ, Taylor RK. (1996) Genetic analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Manes NP, Gustin JK, Rue J, Mottaz HM, Purvine SO, Norbeck AD, Monroe ME, Zimmer JS, Metz TO, Adkins JN, Smith RD, Heffron F. (2007) Targeted protein degradation by Salmonella under phagosome-mimicking culture conditions investigated using comparative peptidomics. *Mol Cell Proteomics.* 6(4):717-27.

McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, Latreille P, Porwollik S, Sabo A, Meyer R, Bieri T, Ozersky P, McLellan M, Harkins CR, Wang C, Nguyen C, Berghoff A, Elliott G, Kohlberg S, Strong C, Du F, Carter J, Kremizki C, Layman D, Leonard S, Sun H, Fulton L, Nash W, Miner T, Minx P, Delehaunty K, Fronick C, Magrini V, Nhan M, Warren W, Florea L, Spieth J, Wilson RK. (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet.* 36(12):1268-74.

Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science.* 313(5784):236-238.

Newman RM, Salunkhe P, Godzik A, Reed JC. (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun.* 74(1):594-601.

Porwollik S, Santiviago CA, Cheng P, Florea L, McClelland M. (2005) Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J Bacteriol.* 187(18):6545-55.

Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, Andrews-Polymenis 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(7):e1000477

Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ. (2000) Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun.* 68(3):1005-13.

Silva C. (2009) "Identificación de genes codificados en islas genómicas que contribuyen a la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis". *Memoria para optar al Título de Bioquímico y Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica Aplicada con mención en Bioquímica de Proteínas y Biotecnologías, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile, Santiago, Chile.*

Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A, Yamamoto T. (2003) Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infect Immun.* 71(2):690-6.

Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Saunders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphreys T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* [Epub ahead of print].

Uribe C, Suárez MC. (2006) Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Revista Colombia Médica.* 37(2): 151-158.

Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(26):15264-9.

Vicente J, Higgins S, Bielke L, Tellez G, Donoghue D, Donoghue A, Hargis B. (2007) Effect of Probiotic Culture Candidates on *Salmonella* Prevalence in Commercial Turkey Houses. *J Appl Poult Res*. 16: 471-476.

Wain J, House D, Pickard D, Dougan G, Frankel G. (2001) Acquisition of virulence-associated factors by the enteric pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 356(1411):1027-34.

Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD. (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect Immun*. 66(7):3365-71.

Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol*. 29(3):883-91.

Zhang XL, Tsui IS, Yip CM, Fung AW, Wong DK, Dai X, Yang Y, Hackett J, Morris C. (2000) *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 68(6):3067-73.