

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Identificación de genes codificados en islas genómicas  
que contribuyen a la virulencia de  
*Salmonella enterica* serovar Enteritidis**

Tesis para Optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica

Área de Especialización: Proteínas y Biotecnología

Memoria para Optar al Título de Bioquímico

**CECILIA ALEJANDRA SILVA VALENZUELA**

Directores de Tesis:

Dra. Lucía Inés Contreras O.

Dr. Carlos Santiviago C.

2009

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN

#### TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

**CECILIA ALEJANDRA SILVA VALENZUELA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Bioquímica en el examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2009

#### **DIRECTORES DE TESIS:**

Dra. Lucía Inés Contreras O.

---

Dr. Carlos Santiviago C.

---

#### **COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS:**

Dra. Cecilia Toro U.

---

Dra. Ana María Kettlun M.

---

Dr. Yedy Israel J .

---

*Esta tesis fue financiada por el Proyecto Anillo de Investigación en Ciencia y Tecnología ADI 08/2006*

*Este trabajo está  
dedicado a mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Inés Contreras por permitirme realizar mi tesis bajo su dirección en el laboratorio y en especial por su apoyo, ayuda, comprensión, cariño, formación, dedicación y confianza.

Al Dr. Carlos Santiviago por su co-dirección, apoyo, cariño, formación, dedicación y confianza.

Al Dr. Michael McClelland por permitirme realizar parte de mi tesis bajo su tutela en su laboratorio en Estados Unidos y por todo el apoyo brindado.

A la Profesora Mercedes Zaldívar y al Dr. Sergio Álvarez por su disposición y ayuda.

A la Dra. Cecilia Toro por su gran apoyo y ayuda para la realización de mi tesis.

A la comisión revisora integrada por: Dra. Cecilia Toro, Dra. Ana María Kettlun y Dr. Yedy Israel, por sus aportes constructivos para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres y hermana por todo su incondicional apoyo, cariño, ayuda, estímulo y motivación a lo largo de toda mi vida.

A Javier Carter y Carlos Blondel por su guía, consejos, ayuda y amistad.

A Mara, Juan, Denisse, Anilei, Carolina y Pía, mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos.

A mis amigos Gonzalo, Pamela, Andrea, Carla y a mis compañeros de carrera por los gratos momentos.

A mis amigos Sabrita, Verónica e Ignacio y por su apoyo, ayuda incondicional y gratos momentos en el laboratorio.

A la Sra. Natividad, Don Luis, Nelson, Carlos y Don Jaime por hacer más fácil el trabajo en el laboratorio.

A Dios, a la Santísima Virgen y a mi Ángel de la Guarda.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1 Reactivos</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 Cepas bacterianas</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3 Plasmidios</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4 Partidores</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 Medios y condiciones de cultivo bacteriano</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6 Técnicas microbiológicas y genéticas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6.1 Análisis del lipopolisacárido en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6.1.1 Obtención de las muestras</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6.1.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6.1.3 Tinción con plata</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6.2 Identificación de fenotipos de LPS mediante lisis utilizando fago P22</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6.2.1 Obtención de lisado P22</b> .....	<b>15</b>

2.6.2.2 Cross streaking.....	16
2.6.3 Generación de mutantes al azar mediante el uso de transposones.....	16
2.6.4 Obtención de mutantes con deleciones de las islas de patogenicidad (SPI) 1, 2, 3, 4 y 5 comunes para el género <i>Salmonella</i> y de las islas: SEN1001-1002, SEN1971-1999, SEN2144A-2145B, SEN4290-4292.....	17
2.6.4.1 Obtención del producto de PCR para la mutagénesis.....	17
2.6.4.2 Mutagénesis .....	18
2.7. Técnicas de Biología Molecular. ....	20
2.7.1 Extracción de ADN genómico .....	20
2.7.2 Extracción de ADN plasmidial.....	21
2.7.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	21
2.7.4 Purificación de ADN desde un gel de agarosa .....	22
2.7.5 Digestión con enzimas de restricción .....	22
2.7.6 Ensayos de Southern Blot.....	22
2.7.6.1 Digestión de ADN y transferencia a la membrana de nitrocelulosa .....	22
2.7.6.2 Prehibridación y marcaje de la sonda .....	23
2.8 “Microarreglo” de ADN.....	25
2.8.1 Preparación de las muestras para microarreglo de ADN .....	25
2.8.2 Transcripción <i>in vitro</i> .....	28
2.8.3 Generación de cADN marcado por incorporación de Cy5/Cy3-CTP .....	28
2.8.4 Pre-hibridación e hibridación del “microarreglo”.....	30
2.8.5 Análisis de los resultados .....	31
2.9 “Genetic Footprinting” .....	31

2.10	Ensayos de virulencia <i>in vivo</i> .....	32
2.10.1	Ensayos <i>in vivo</i> de colonización de órganos internos en ratones BALB/c.....	32
2.10.2	Ensayos de competencia <i>in vivo</i> en ratones BALB/c.....	33
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
3.1.	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis es capaz de colonizar hígado y bazo de ratones BALB/c en ensayos de virulencia <i>in vivo</i> .....	35
3.2	La estrategia de selección negativa analizada mediante “microarreglos” permite identificar genes involucrados en la enfermedad sistémica .....	37
3.2.1	Generación de una genoteca de mutantes al azar por inserción mediante el uso de transposones.....	37
3.2.2	Análisis de fenotipos y genotipo de mutantes obtenidas al azar por inserción mediante el uso de transposones.....	38
3.2.3	Ensayo de colonización <i>in vivo</i> de de órganos internos en ratones BALB/c usando una genoteca de mutantes al azar por la inserción de un transposón .....	44
3.2.4	Análisis global de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> que presenten deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c por “microarreglos” .....	45
3.3	Mutantes en regiones específicas de <i>S. Enteritidis</i> presentan diversos niveles de atenuación de colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c.	
3.3.1	Ensayos de competencia <i>in vivo</i> .....	54
3.3.2	Identificación de inserciones en regiones cromosomales específicas mediante el empleo de “genetic footprinting”.....	55
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>



5. CONCLUSIONES .....	66
6. BIBLIOGRAFÍA.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis. ....	<b>10</b>
<b>Tabla 2.</b> Plasmidios utilizados en la presente Tesis .....	<b>10</b>
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados en la presente Tesis .....	<b>11</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ensayo de virulencia <i>in vivo</i> en ratones BALB/c .....	<b>35</b>
<b>Figura 2.</b> Morfología de bazo e hígado de ratones BALB/c inoculados con <i>S. Enteritidis</i> PT4 en un ensayo de virulencia <i>in vivo</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 3.</b> Colonización de <i>S. Enteritidis</i> en bazo e hígado de ratones BALB/c <i>in vivo</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 4.</b> Detección de la presencia del transposón mediante PCR .....	<b>39</b>
<b>Figura 5.</b> Southern Blot de mutantes seleccionadas desde la genoteca de mutantes por inserción al azar del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2>.....	<b>40</b>
<b>Figura 6.</b> Comparación del crecimiento de colonias obtenidas de la genoteca en medios de cultivo AL y mínimo E.....	<b>41</b>
<b>Figura 7.</b> Ensayo de sensibilidad al fago lítico P22 H5 para mutantes escogidas de manera aleatoria.....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b> Análisis del perfil electroforético de preparaciones de LPS obtenidas a partir de mutantes escogidas de manera aleatoria .....	<b>44</b>
<b>Figura 9.</b> Colonización de la genoteca de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> en bazo e hígado de ratones BALB/c <i>in vivo</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 10.</b> Análisis global de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> pertenecientes a una genoteca de transposones que presenten deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c.....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Análisis global de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> pertenecientes a una genoteca de transposones que presenten deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c por “microarreglos” .....	<b>49</b>

<b>Figura 12.</b> Ensayo de competencia <i>in vivo</i> en ratones BALB/c.....	<b>55</b>
<b>Figura 13.</b> Análisis de “genetic footprinting” en la región cromosomal cercana al gen <i>SEN2144A</i> .....	<b>56</b>

## ABREVIATURAS

AL	Agar Luria
CL	Caldo Luria
DO	Densidad óptica
LPS	Lipopolisacárido
AgO	Antígeno O
min	Minutos
h	Horas
seg	Segundos
g	Gramos
L	Litro
μl	Microlitro
μg	Microgramo
Kan	Kanamicina
Amp	Ampicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
°C	Grados Celsius
M	Concentración molar
N	Concentración normal
μm	micrómetro
pb	Pares de bases
kb	Kilobases
ufc	Unidades formadoras de colonias.
r. p. m	Revoluciones por minuto

## RESUMEN

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que infecta una gran variedad de hospederos, incluyendo aves de corral, roedores (ratones) y humanos. *S. Enteritidis* es un patógeno intracelular facultativo, capaz de invadir células epiteliales y generar una enfermedad sistémica en aves y ratones, mientras que en el hombre provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal. La transmisión de la bacteria al humano ocurre principalmente a través del consumo de huevos contaminados. Por su parte, la contaminación de los huevos puede ocurrir por vía transovárica (vertical) o a través de la cáscara (horizontal).

En la actualidad, *S. Enteritidis* representa la causa mayoritaria de salmonelosis asociada a alimentos a nivel mundial y es el serovar de *Salmonella* aislado con mayor frecuencia en Chile. Este problema se ha tratado de abordar mediante el diseño de vacunas para aves de postura, ya sea utilizando mutantes vivas atenuadas o bacterias muertas por agentes químicos o calor. En las primeras se ha obtenido una menor colonización intestinal, en tanto que bacterias muertas no han tenido efecto alguno sobre la liberación del patógeno en las deposiciones, lo cual no es suficientemente eficaz para interferir en la transmisión del patógeno.

Los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por *Salmonella enterica* involucran una gran cantidad de genes, generalmente agrupados en regiones denominadas islas genómicas. Éstas pueden contribuir directamente a la virulencia del patógeno (islas de patogenicidad) u otorgar nuevas características que le permitan cursar un ciclo infeccioso exitoso. Se piensa que existe similitud entre los mecanismos de patogenicidad utilizados por *S. Enteritidis* en aves y roedores y los utilizados por *S. Typhimurium* para causar una enfermedad sistémica en el ratón. No obstante, el papel que cumplen

muchas de las islas genómicas y de patogenicidad de *S. Enteritidis* en virulencia sigue siendo desconocido. Este desconocimiento, sumado a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos empleados en el tratamiento de la enfermedad, determina que aún no se cuente con una vacuna eficaz.

Considerando los antecedentes mencionados, en el presente proyecto se propuso identificar genes codificados en islas genómicas de *S. Enteritidis* que participaran en virulencia. Para ello se realizó un análisis global de cepas mutantes que presentaron deficiencias en la colonización de órganos internos de ratón mediante hibridaciones en un “microarreglo” genómico diseñado para *Salmonella* y una posterior confirmación del fenotipo por análisis de mutantes con deleciones específicas de los genes previamente identificados.

Como resultado de este trabajo, se identificaron genes necesarios para la colonización de hígado y bazo en ratones BALB/c. Algunos de ellos se encontraron en islas genómicas pertenecientes a *S. Enteritidis*. Dentro de este grupo, existen genes que no han sido relacionados previamente con la virulencia del patógeno, como genes que codifican: un sistema de restricción y modificación de tipo I, los componentes de una fimbria no descrita en la literatura e islas genómicas que podrían codificar factores de virulencia hipotéticos. También se encontraron genes individuales y otros codificados en islas de patogenicidad conservados entre los distintos serovares de *Salmonella*.

El análisis global de genes involucrados en la enfermedad sistémica realizada en esta tesis, permitió identificar genes o regiones genómicas específicas de *S. Enteritidis* que participarían en virulencia. Estos resultados ayudarán a detectar nuevos blancos para el potencial desarrollo de vacunas.

## SUMMARY

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) is a Gram-negative bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* family and able to infect a wide variety of hosts, including birds, rodents (mice) and humans. *S. Enteritidis* is a facultative intracellular pathogen which invades epithelial host cells and uses macrophages to disseminate and cause a systemic infection in poultry and mice, whereas in humans it only causes diarrhea, fever and abdominal pain. The transmission to humans happens through the consumption of contaminated eggs and egg products. The eggs contamination occurs by the transovarian route (vertical transmission) or across the shell (horizontal transmission).

In recent years, *S. Enteritidis* has emerged as the primary cause of food-borne salmonellosis worldwide, and is the *Salmonella* serovar most frequently isolated in Chile. This public health concern has been addressed by the design of vaccines for laying hens using live, attenuated mutants or bacteria killed by chemical agents or heat. The first approach only produced a mild decrease in intestinal colonization, while the use of dead bacteria has showed no effect on the liberation of the pathogen in the depositions.

The molecular mechanisms of pathogenicity used by *Salmonella* involve a great amount of genes, generally clustered in regions known as genomic islands. These islands contribute directly to the virulence of the pathogen (Pathogenicity islands) or confer new characteristics allowing the bacteria to establish a successful infection. A similarity between the mechanisms used by *S. Enteritidis* to infect poultry and those used by *S. Typhimurium* to cause a systemic infection in mice has been proposed. However, the role in virulence played by many of the genomic and pathogenicity islands of *S. Enteritidis* still remains unknown. This, in addition to the emergence of strains resistant to the antibiotics commonly used to treat the disease determines that still no effective vaccine is available.



Considering the mentioned antecedents, in the present study we identified several genes encoded in genomic islands of *S. Enteritidis*, being required for virulence *in vivo*. To accomplish this, we used a microarray-based and genome-wide, high-throughput negative selection screen for mutants showing deficiencies in the colonization of internal organs of mice, and the confirmation of the observed phenotype by analysis of individual mutants in some of the genes or genomic islands identified.

The results of our work demonstrate that there are several genes required for the colonization of spleen and liver of BALB/c mice that are encoded in genomic islands belonging to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In this group, we found genes that have not been reported to play a direct role in virulence, so our results are novel and help in the identification of targets for the development of new vaccines.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El género *Salmonella* comprende dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*, que agrupan a más de 2500 serovares causantes de una variedad de enfermedades en el hombre y otros vertebrados (Brenner y cols., 2000). Dentro de la especie *S. enterica* se encuentra *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) la cual posee la capacidad de infectar un amplio rango de hospederos (Galán y cols., 1996).

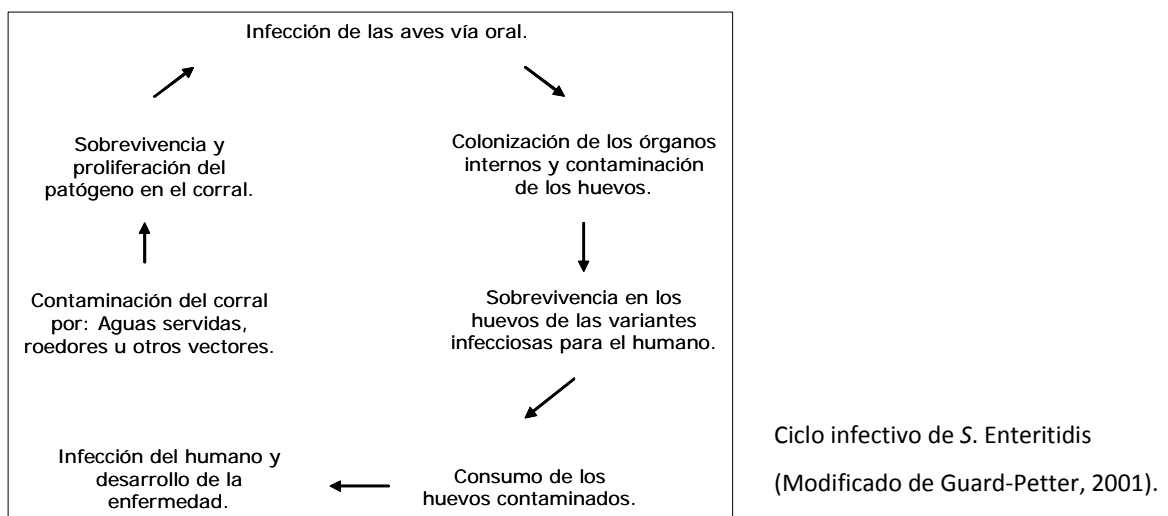
En la actualidad, *S. Enteritidis* es el principal agente etiológico de salmonelosis asociada a alimentos a nivel mundial. Esta enfermedad se contrae mediante el consumo de huevos contaminados de una gallina aparentemente sana (Parker y cols., 2001). Estudios epidemiológicos sugieren que *S. Enteritidis* ocupó el nicho ecológico disponible luego de la erradicación del serovar Gallinarum en aves de corral. De esta manera, se produjo un aumento progresivo de las infecciones causadas por *S. Enteritidis* en humanos asociadas al consumo de huevos o productos avícolas contaminados y mal manipulados (Guard-Petter, 2001).

### **Transmisión Zoonótica**

La infección del ave se produce por la contaminación del ambiente del corral por contacto con aguas residuales y roedores (reservorio natural de *S. Enteritidis*) entre otros factores. La bacteria es capaz de sobrevivir y proliferar en este ambiente para luego infectar a las aves por vía oral. El ciclo infectivo de *S. Enteritidis* en el ave y en roedores se divide en dos etapas que comprenden la colonización y posterior invasión del epitelio intestinal y la diseminación a órganos internos (principalmente bazo e hígado) generando un cuadro de infección sistémica. En las aves, el

microorganismo es capaz de infectar y sobrevivir tanto en los oviductos como en los huevos, además de excretarse en las deposiciones continuando el ciclo infeccioso (Guard-Petter, 2001) (Fig. 1).

La transmisión de la bacteria a los huevos puede ocurrir por dos vías: transovárica (transmisión vertical) o a través de la cáscara (transmisión horizontal). En la primera, los microorganismos colonizan el oviducto y entran en contacto con los huevos antes del proceso de la formación de la cáscara. En la segunda, la transmisión ocurre a través del contacto de los huevos con materia fecal contaminada. Esta transmisión horizontal puede ser reducida eficazmente por medidas de limpieza y desinfección (Guard-Petter, 2001).



*S. Enteritidis* produce infecciones asintomáticas en aves adultas (mayores a dos semanas de vida). Sin embargo, en aves jóvenes ocurre desarrollo de enfermedad sistémica e incluso la muerte. La diferencia entre las consecuencias de la infección en aves jóvenes y adultas se debería a que las aves de edad más temprana carecen de una flora intestinal que compita por los receptores intestinales o produzca agentes inhibidores del crecimiento de *Salmonella* (Guard-Petter, 2001). En el ser humano, la bacteria provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal, como su principal

manifestación clínica. Esta enfermedad tiene un corto período de incubación que no supera los 3 días y que generalmente se expresa en menos de 24 horas. Su duración es autolimitada, alcanzando en promedio 8 días (Hennessy y cols., 1996).

### **Fagotipos y epidemiología de *S. Enteritidis***

Ward y cols. (1987) utilizaron un panel de bacteriófagos líticos para desarrollar un esquema de tipificación para cepas de *S. Enteritidis*, identificando 27 fagotipos (PT) distintos. Los fagotipos PT1 y PT4 corresponden a los de mayor prevalencia en aislados clínicos en Chile. El fagotipo PT1 es característico de Europa, mientras que el PT4 se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Esto sugiere que los aislamientos circulantes en la actualidad en Chile fueron introducidos en los planteles avícolas desde fuentes externas al país, aunque hoy en día pueden ser considerados domésticos (Fica y cols., 2001). En el caso de cepas aisladas de productos avícolas, los fagotipos predominantes son PT4 y PT7, lo que sugiere que no todos los aislados del reservorio avícola representan igual riesgo para el ser humano. En vista de estos antecedentes, sería pertinente focalizar los estudios de patogenicidad en cepas PT4; el fagotipo predominante en ambos hospederos.

### **Estrategias de control de *S. Enteritidis***

La transmisión vertical es la principal vía de contaminación de huevos por *S. Enteritidis* y la más difícil de combatir. Para esto, es necesario disminuir la colonización intestinal o erradicar la bacteria del reservorio avícola. Este problema se ha abordado mediante el diseño de vacunas para aves de postura, utilizando estrategias convencionales como la generación de mutantes vivos atenuados o bacterias muertas por agentes químicos o calor. Utilizando vacunas vivas atenuadas se ha demostrado la inducción de respuesta inmune celular capaz de disminuir la colonización intestinal y de

órganos internos. Sin embargo, esto ocurre por lapsos cortos de tiempo (7 a 10 días) (Methner y cols., 2004; Betancor y cols., 2005; Bohez y cols., 2007) por lo que estas vacunas han tenido un éxito relativo. Por otra parte, el uso de bacterias muertas induce una mayor respuesta inmune humoral, pero sin efectos sobre la liberación del patógeno en las deposiciones (Cerquetti y Gherardi, 2000; Babu y cols., 2004; Betancor y cols., 2005).

Los antecedentes mencionados, sumados a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos comúnmente empleados en el tratamiento de la enfermedad y al desconocimiento de los mecanismos moleculares mediante los cuales el patógeno coloniza sus hospederos y desarrolla la enfermedad, determinan que aún no se cuente con un tratamiento eficaz. Ante este panorama, es de vital importancia la creación de nuevas vacunas.

#### **Características genómicas de *Salmonella* y mecanismos moleculares de patogenicidad**

Los mecanismos moleculares de patogenicidad empleados por *Salmonella enterica* involucran una gran cantidad de genes, generalmente agrupados en regiones denominadas islas genómicas. Éstas pueden contribuir directamente a la virulencia del patógeno (islas de patogenicidad) u otorgar nuevas características que le permitan cursar un ciclo infectivo exitoso. Estos fragmentos de ADN, generalmente adquiridos por transmisión horizontal, se consideran esenciales para la supervivencia del microorganismo en el hospedero, lo que explica la estabilidad que presentan dichos elementos genéticos una vez adquiridos. Notablemente, el papel que cumplen muchas de las islas genómicas y de patogenicidad de *S. Enteritidis* en la virulencia sigue siendo desconocido.

Se piensa que existe una similitud entre los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por *S. Enteritidis* en aves y roedores y los utilizados por *S. Typhimurium* para causar una enfermedad sistémica en el ratón. Cabe señalar que el modelo *S. Typhimurium*-ratón es el más usado

para estudios de patogenicidad en *Salmonella enterica*. En dicho modelo, la infección se inicia con el ingreso de la bacteria al tracto digestivo por ingestión de comidas o aguas contaminadas, accediendo al epitelio del intestino delgado. La bacteria es capaz de entrar o invadir las células epiteliales, que normalmente no son fagocíticas (Galán y cols., 1996). Este proceso es mediado por un sistema de secreción de proteínas tipo III (SSTT) codificado en la Isla de Patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1), el cual inyecta proteínas efectoras hacia el citoplasma de las células eucariontes provocando el reordenamiento del citoesqueleto de actina y promoviendo la internalización de la bacteria por un proceso similar a la fagocitosis. Una vez dentro de la célula eucarionte, la bacteria es capaz de sobrevivir y proliferar, para posteriormente abandonar el epitelio intestinal y tomar contacto con las células dendríticas y los macrófagos. La supervivencia de *Salmonella* en el interior de estas células fagocíticas es mediada por un segundo SSTT codificado en la SPI-2 y por sus correspondientes proteínas efectoras. También existen proteínas involucradas en virulencia que están codificadas dentro de otras islas de patogenicidad, denominadas SPI-3, SPI-4 y SPI-5. La SPI-3 contiene genes que codifican proteínas esenciales para el crecimiento intracelular en condiciones limitantes de magnesio. La SPI-4 posee genes que codifican un sistema de secreción de tipo I que media la secreción de una adhesina no fimbrial que participaría en la colonización intestinal y en la adaptación al medio intracelular en macrófagos. Por último, la SPI-5 codifica proteínas efectoras involucradas en el desarrollo de la enterocolitis y que no serían requeridas para la infección sistémica del hospedero (Hensel, 2004; Figueroa-Ochoa y Verdugo, 2005).

Análisis bioinformáticos han establecido que alrededor del 80% de los genes presentes en los serovares de *Salmonella* son homólogos entre sí, difiriendo aproximadamente en un 3% de su secuencia. El 20% restante de cada genoma es único, definiendo islas genómicas específicas de cada serovar (Bäumler y cols., 1998). Algunos genes codificados en estas islas específicas podrían ser una de

las causas de la variabilidad en patogenicidad que presentan los distintos serovares de *Salmonella* (Ochman y Groisman, 1996; Amavisit y cols., 2003).

Considerando estos antecedentes, en el presente proyecto nos propusimos identificar genes codificados en islas genómicas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis que participan en la virulencia de la bacteria. Los resultados de esta tesis demuestran que existen diversos genes necesarios para la colonización de órganos internos en ratones BALB/c y algunos de éstos se encuentran en islas genómicas pertenecientes a *S. Enteritidis*. Dentro de este grupo, existen genes que no han sido relacionados previamente con la virulencia del patógeno, siendo así resultados novedosos que ayudarán a identificar nuevos blancos para el potencial desarrollo de vacunas.

## **HIPÓTESIS**

Genes codificados en islas genómicas contribuyen a la virulencia de *S. Enteritidis*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de genes codificados en islas genómicas en la virulencia de *S. Enteritidis* en un modelo animal para su potencial uso en el desarrollo de nuevas vacunas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la capacidad de la cepa PT4 de *S. Enteritidis* (NCTC 13349) para colonizar órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c.
2. Generar una genoteca de mutantes de *S. Enteritidis* PT4 por inserción de un transposón e identificar de manera global aquellas mutantes que presenten deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c y que se encuentren codificadas en islas genómicas.
3. Generar cepas mutantes definidas de *S. Enteritidis* PT4 con deleciones de genes o islas genómicas identificados en el Objetivo específico 2.
4. Evaluar la capacidad de las nuevas mutantes generadas para colonizar órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c en un ensayo de competencia con la cepa PT4 silvestre.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Reactivos.

De Amersham Biosciences se obtuvo: Cy3-dCTP y Cy5-dCTP.

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

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

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: kit para purificación de bandas desde gel "Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System".

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: Taq ADN polimerasa, dTTP, dCTP, dATP, dGTP, ATP, transcriptasa reversa Superscript II, partidores CCT<sub>24</sub>VN, DOPR2, KAN2FP1-B, STM2899\_(H1+P1), STM2865\_(H2+P2), STM1393\_(H1+P1), STM1422\_(H2+P2), STM3764\_(H1+P1), STM3752\_(H2+P2), STM4257\_(H1+P1), STM4262\_(H2+P2), STM1094\_(H1+P1), STM1087\_(H2+P2), STM2899\_Out5, STM2865\_Out3, STM1393\_Out5, STM1422\_Out3, STM3764\_Out5, STM3752\_Out3, STM4257\_Out5, STM4262\_Out3, STM1094\_Out5, STM1087\_Out3, SEN1999\_(H1+P1), SEN1971\_(H2+P2), SEN2144A\_(H2+P2), SEN4292\_(H1+P1).

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato de sodio, glucosa, cloroformo, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, glicerol, ácido clorhídrico, isopropanol, ácido acético glacial, ácido

periódico, hidróxido de sodio, amoníaco, nitrato de plata, ácido bórico, formaldehído, etanol absoluto, fosfato monoácido de potasio trihidratado, ortofosfato de amonio y de sodio tetrahidratado.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, estreptomina, arabinosa, azul de bromofenol, xileno-cianol, proteinasa K, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), ribonucleasa A, kit de extracción de ADN genómico "GenElute Bacterial Genomic DNA" y filtros Millipore de 0,025 µm.

De Fermentas se obtuvo: Estándares de peso molecular GeneRuler de 100pb y 1Kb, enzimas de restricción.

De KPL se obtuvo: kit para marcación de sondas para southern blot "PCR DNA Biotinylation" y kit para revelado "HRP Southern Blotting".

De Epicentre se obtuvo: kit para transposición *in vitro* "EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> Promoter Insertion Kit" y kit para transcripción *in vitro* "AmpliScribe T7 Transcription Kit".

De Qiagen se obtuvo: kit para purificación de productos de PCR "QIAquick PCR purification kit", columnas para purificación de ARN "RNeasy Mini Kit" y kit para extracción de ADN plasmidial "QIAprep Spin Miniprep kit".

De Fermelo S.A. se obtuvo: partidores KAN-2(F), KAN-2(R), MEKAN2-B, SEN1001\_(H1+P1), SEN1001\_(H2+P2), SEN1002\_(H1+P1), SEN1002\_(H2+P2), SEN2145B\_(H1+P1), SEN4290\_(H2+P2), K1, C2, SEN1001\_Out5, SEN1002\_Out5, SEN1999\_Out5, SEN2145B\_Out5, SEN4292\_Out5

## 2.2. Cepas bacterianas.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis.

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Fuente o Referencia
<b><i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis</b>		
S.Enteritidis PT4	cepa silvestre	Sanger Institute
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
BW25113/pKD46	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787 lacI p-4000(lacI^R)$ $\lambda-$ <i>pos396(Am) rph-1</i> $\Delta(rhaD-rhaB)$ 568 <i>rrnB-3 hsdR514</i> / pKD46. Cepa portadora del plasmidio pKD46.	M. Valvano
DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir/pCLF4	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15lambda pir / pCLF4</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF4.	Stock del laboratorio
DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir/pCLF2	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15lambda pir / pCLF2</i> . Cepa portadora del plasmidio pCLF2.	Stock del laboratorio

## 2.3. Plasmidios.

**Tabla 2.** Plasmidios utilizados en la presente Tesis.

Plasmidio	Características	Fuente o Referencia
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gam bet exo ori</i> R <sub>pSC101</sub> (TS), Amp <sup>R</sup>	Datsenko y Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 <i>oriR6K</i> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , promotor T7	Stock del laboratorio
pCLF2	<i>bla</i> FRT <i>cam</i> FRT PS1 PS2 <i>oriR6K</i> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , promotor T7	Stock del laboratorio

## 2.4. Partidores.

Tabla 3. Partidores utilizados en la presente Tesis.

Nombre	Partidor
KAN-2(F)	ATGAGCCATATTCAACGGGAAA
KAN-2(R)	CGAGCATCAAATGAAACTGCAA
MEKAN2-B	GGTTGAGATGTGTATAAGAGACAG
CCT <sub>24</sub> VN	CCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
DOPR2	CAACGCAGACCGTTCCGTGGCA
KAN2FP1-B	GTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
C3	CAGCTGAACGGTCTGGTTATAGG
STM2899_(H1+P1)	GCGCAAAGCTGCATATGTCATTTTCTGAAAGCCGACACAATGAA <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
STM2865_(H2+P2)	TATAATTTTATTACGGTTAAGTAAAGACTTATATTCAGC <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
STM2899_Out5	ATGAGGCGCCATGTTTTTAC
STM2865_Out3	ATGAAATCGTACCAGAGGCG
STM1393_(H1+P1)	ACTCCATTTATGTCTGAGGAGGGATTTCATGCTGGCAGTT <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
STM1422_(H2+P2)	GCATACAAAAGCATTATGGTGTTCGGTAGAATGCGCATAATC <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
STM1393_Out5	GCCGTTTCTGAACCATTGAT
STM1422_Out3	GTGCCAGGCTAAAAGCGAT
STM3764_(H1+P1)	ATTCTTCCAGAAAAAATGGAGGAACGTATGTTAATGTTTCCTTAT <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
STM3752_(H2+P2)	GCCAAAATTATGAGATCAACGTATAGAGCCATCCGGATAAAGATA <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
STM3764_Out5	TGCAGGCATCATAACAGAGC
STM3752_Out3	TTGTGGGATATCGTCTGCAA
STM4257_(H1+P1)	ATATCAGGAGACAACATGGAAGACGAAAGTAATCCGTGGCCTAGT <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
STM4262_(H2+P2)	CAAGCGCTGCTATTTTACATTAATAATTTATCCGGAGAACAATC <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
STM4257_Out5	CGTATTGGTAGCAGGAAGCC
STM4262_Out3	CCAAAAATGGCAAGTGAAT
STM1094_(H1+P1)	GGGAACCTTTATGAAAAAGTATCTTGCATTCGCCGTTACG <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
STM1087_(H2+P2)	CGTTTCCCGATGTGTCTATTTATTGAAGATGTAGACCATTCTGGG <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>

STM1094_Out5	AGGACAGGTTCTGTTCCCCT
STM1087_Out3	TTCCGCCAGATTAACAAGG
SEN1001_(H1+P1)	AATTTTACAAATGAATGGAGGGTTGCACATGGTAAATCGC <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
SEN1001_(H2+P2)	CTTGTAACGTTATTTACTCTCATCTGCGACAATGAGAGC <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
SEN1001_Out5	TCTCGATTGCGCATGTAGTC
SEN1002_(H1+P1)	GGAGATTAACATGGCCAATTTAATTTATTTAACTGAAC <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
SEN1002_(H2+P2)	AAAATTTTACTAAAAACCCCTCTCATCCATAAACTGAA <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
SEN1002_Out5	GATGCAGATGATGCATACCG
SEN1999_(H1+P1)	TTTTTAGGGAAAAGAATGACAAAAAGATTGCCTGTGCGGAGAA <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
SEN1971_(H2+P2)	TCTCCCTGTTACTTACTACTTACGCCCTTTGTTTGATTGTGCCAA <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
SEN1999_Out5	TGAACGATCTTCCTGTGCTG
SEN2145B_(H1+P1)	GGAAGAGATTATGAAACGTTCACTTATTGCTGCTTCTGTA <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
SEN2144A_(H2+P2)	TACCGCATAAATTTAATTATAAGATACCACGATTAATGCTTTCGA <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
SEN2145B_Out5	GGTGATAGCACCCGACAGAT
SEN4292_(H1+P1)	ATATATAGGTGTAATATGGCAATCATTATCCCACCGTAAGTAGC <u>GTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
SEN4290_(H2+P2)	TCATATAACATTATAAATTC AACGAGGTGAGTTTGTGCTG <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
SEN4292_Out5	AACACCAGTACCGCATCCTC
SEN2144A_Out5	TTCCCTACGCTGGCATTATC
SEN2145_Out5	AATTCGCAAACCTGGATCAC
SEN2145_Out3	CCAGCATTAAAGCTGTCGGAT
SEN2146_Out5	GCTGGCGGAAAAATACCATA

---

Las secuencias que hibridan con las regiones P1 y P2 en los plasmidio pCLF2 y pCLF4 están subrayadas (ver más adelante).

## **2.5. Medios y condiciones de cultivo.**

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 utilizando medio mínimo E (MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,2 g/l, ácido cítrico monohidratado 2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x3H<sub>2</sub>O, 13,1 g/l, NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>x4H<sub>2</sub>O 3,3 g/l) que contiene 0,2% de glucosa estéril como fuente de carbono. Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en los mismos medios base conteniendo 15 g/l de Bacto agar. Aquellas cepas que poseían plasmidios de replicación termosensible (pKD46) se incubaron a 30°C. Cuando fue necesario curarlas de estos plasmidios, las cepas se crecieron sin selección a una temperatura no permisiva (42°C). Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) 100 µg/ml, kanamicina (Kan) 50 µg/ml, cloranfenicol (Cam) 20 µg/ml, ácido nalidíxico (Nal) 15 µg/ml, Estreptomina (Strp) 40 µg/ml.

## **2.6. Técnicas Microbiológicas y Genéticas**

### **2.6.1 Análisis del lipopolisacárido (LPS) en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina**

#### **2.6.1.1 Obtención de las muestras**

Se realizó a partir de modificaciones al método de Hitchcock y Brown (1983). Las cepas se crecieron durante toda la noche a 37°C en 3 ml de CL con los antibióticos correspondientes, si fuera el caso. Se tomó una alícuota de 1 ml, se midió la DO<sub>600</sub> y se ajustó a un valor de 2 usando CL de modo de obtener aproximadamente el mismo número de bacterias por muestra. Una vez obtenido el volumen necesario, se centrifugó a 14.000 r. p. m. durante 2 min; el sedimento obtenido se resuspendió en 90 µl de tampón de lisis (SDS 2%, β- mercaptoetanol 4%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,002% en Tris 1

M pH 6,8) y se hirvió durante 10 min. Finalmente, a cada lisado se agregó 10 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 60°C durante 1 h. Las muestras se conservaron a 4°C para su posterior uso.

#### **2.6.1.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron en una cámara mini-Protean III utilizando la técnica descrita por Lesse y colaboradores (1990). Para el gel resolutivo se mezclaron 1.460 µl de solución de 49,5% acrilamida total – 6% bisacrilamida, 1.660 µl de tampón de gel (Tris-HCl 3,0 M pH 8,45 y SDS 0,3%), 520 µl de glicerol, 1.350 µl de H<sub>2</sub>O destilada, 100 µl de APS 10% y 6 µl de TEMED. Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con 200 µl de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador, que se preparó mezclando 250 µl de solución 49,5% acrilamida total –3% bisacrilamida, 775 µl de tampón de gel, 2.100 µl de H<sub>2</sub>O destilada, 75 µl de APS 10% y 6 µl de TEMED. La cámara de electroforesis se llenó con solución anódica (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9) y catódica (Tris-HCl 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25). En los geles se cargaron 2 µl de muestra (aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc) y la electroforesis se realizó a 50 Volts mientras las muestras permanecían en el gel concentrador y a 150 Volts cuando éstas entraron en el gel resolutivo.

#### **2.6.1.3 Tinción con plata**

Se realizó según modificaciones del método de Tsai y Frasch (1982). Una vez retirado el gel de la cámara de electroforesis, se fijó durante toda la noche en 200 ml de una solución 40% etanol absoluto y 5% ácido acético glacial. Se oxidó con agitación durante 10 min con 200 ml de una solución 40% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial y 0,7% ácido periódico. Se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se tiñó durante 15 min con 150 ml de una solución que contenía

28 ml NaOH 0,1 M, 2 ml amoníaco 25%, 115 ml H<sub>2</sub>O destilada y 5 ml AgNO<sub>3</sub> 10%. Nuevamente se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se reveló de 5 a 20 min (hasta coloración deseada) en 250 ml de una solución que contenía 12,5 mg ácido cítrico monohidratado y 125 µl formaldehído 37%. Finalmente la reacción se detuvo con al menos tres lavados de 5 min con H<sub>2</sub>O destilada.

## **2.6.2 Identificación de fenotipos de LPS por ensayo de sensibilidad a fago P22.**

### **2.6.2.1 Obtencion de lisado P22**

Para la obtención de un lisado puro del fago P22 H5 (fago lítico) propagado en *S. Enteritidis* PT4, se cultivó la cepa durante toda la noche en 1 ml de CL a 37°C. Al día siguiente se fundió agar blando (triptona 10 g/l, cloruro de sodio 8 g/l, Bacto agar 7 g/l) y se agregó 3 ml a tubos de ensayo estériles manteniendo la temperatura a 50°C. Una vez hecho esto se agregó 200 µl de cultivo al agar fundido y se mezcló. Luego, se añadió 5 µl de un lisado antiguo de fago P22 H5 en la superficie de una placa de AL. y se vació sobre la placa la mezcla de agar blando y bacterias. Se esperó la gelificación por aproximadamente 10 a 15 min y se incubó en una estufa a 37°C toda la noche.

Posteriormente, utilizando una pipeta pasteur se tomó una placa de lisis desde el agar blando, se inoculó en 10 ml de un cultivo de *S. Enteritidis* PT4 en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}= 0,4$ ) y se cultivó por 4 h a 37°C en un agitador orbital. Por último, una alícuota del cultivo se centrifugó por 2 min a 13.000 r. p. m. en microcentrífuga para precipitar los restos celulares, el sobrenadante se filtró a través de filtros Millipore de 0,025 µm y se agregaron algunas gotas de CHCl<sub>3</sub>. El lisado obtenido se conservó a 4°C para su uso posterior.



### **2.6.2.2 Cross streaking**

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.

### **2.6.3. Generación de mutantes al azar mediante el uso de transposones.**

Para la obtención de la genoteca de mutantes por inserción al azar de transposón, se prepararon células electrocompetentes, para esto se cultivó la cepa silvestre (wt) a 37°C en CL con agitación hasta una  $DO_{600}$  de 0,4. Se centrifugó 3 ml del cultivo a 13.000 r. p. m. por 2 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 700 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente a 13.000 r. p. m. por 2 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 50 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada.

El transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Epicentre) se incubó *in vitro* con la transposasa del Tn5, formando así complejos estables (transposomas) los cuales se electroporaron en las bacterias competentes utilizando un electroporador Electroporator 2510 (Eppendorf). Este procedimiento se realizó a 1.8 KV, usando cubetas desechables y estériles de 1 mm de separación entre electrodos. Las mutantes se seleccionaron en placas de AL suplementado con Kan (50 µg/ml) (AL+Kan) incubando toda la noche a 37°C. El proceso completo se realizó cuatro veces. Todas las colonias obtenidas se resuspendieron y posteriormente se lavaron en PBS estéril. Finalmente, se resuspendieron en CL

suplementado con glicerol (15%), se alicuotó en volúmenes de 1 ml y las alícuotas de esta genoteca de mutantes se mantuvieron congeladas a -80°C para su uso posterior (Modificación del protocolo descrito por Chan y cols, 2005).

#### **2.6.4. Obtención de mutantes con deleciones de las islas de patogenicidad (SPI) 1, 2, 3, 4 y 5 comunes para el género *Salmonella* y de las islas *SEN1001-SEN1002*, *SEN1971-SEN1999*, *SEN2144A-SEN2145B* y *SEN4290-SEN4292*.**

##### **2.6.4.1 Obtención del producto de PCR para la mutagénesis**

Se diseñaron partidores de 60 nucleótidos, cuyos extremos 5' contenían 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen o isla genómica a mutar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos (subrayados en las secuencias, ver Tabla 3) cuya secuencia hibrida perfectamente con las regiones P1 y P2 presentes en los plasmidios pCLF4 y pCLF2. Estos plasmidios poseen en su secuencia un “cassette” génico compuesto por el gen *aph* (resistencia a kanamicina) o por el gen *cam* (resistencia a cloranfenicol) respectivamente, flanqueado por la secuencia FRT. La amplificación de este “cassette” se realizó utilizando los partidores: STM2899\_(H1+P1), STM2865\_(H2+P2), para mutar la SPI-1; STM1393\_(H1+P1), STM1422\_(H2+P2) para mutar la SPI-2; STM3764\_(H1+P1), STM3752\_(H2+P2) para mutar la SPI-3; STM4257\_(H1+P1), STM4262\_(H2+P2) para mutar la SPI-4; STM1094\_(H1+P1), STM1087\_(H2+P2) para mutar la SPI-5; SEN1001\_(H1+P1), SEN1001\_(H2+P2) para mutar el gen *SEN1001*; SEN1002\_(H1+P1), SEN1002\_(H2+P2) para mutar el gen *SEN1002*; SEN1999\_(H1+P1), SEN1971\_(H2+P2) para mutar la isla comprendida entre los marcos de lectura *SEN1971* y *SEN1999*; SEN2145B\_(H1+P1), SEN2144A\_(H2+P2) para mutar la isla comprendida entre los marcos de lectura *SEN2144A* y *SEN145B* y SEN4292\_(H1+P1), SEN4290\_(H2+P2) para mutar la

isla comprendida entre los marcos de lectura *SEN4290* y *SEN4292* (Tabla 3), según la siguiente reacción de PCR:

Tampón de PCR 5X	20	μl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	6	μl
dNTP's 10X [2 mM cada uno]	2	μl
Partidor 1 [10μM]	1	μl
Partidor 2 [10μM]	1	μl
ADN [pCLF]	1	μl
H <sub>2</sub> O	68,5	μl
Taq ADN polimerasa [5 U/μL]	0,5	μl
Volumen final	100	μl

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 5 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 1 min y 45 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 7 min). Los productos de amplificación se purificaron con el kit "QIAquick PCR purification" de Qiagen (Modificación del método descrito por Datsenko y Wanner, 2002).

#### **2.6.4.2 Mutagénesis**

La mutagénesis se realizó sobre la cepa *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  $P_{araBAD}$ , inducible por arabinosa. Para obtener la cepa PT4/pKD46, se prepararon células PT4 electrocompetentes como se describió anteriormente. Se mezclaron 50 μl de células electrocompetentes con ADN (5 μl) de plasmidio pKD46 previamente dializado en agua usando filtros de nitrocelulosa de 0,025 mm (Millipore) y se electrotransformó en un electroporador Electroporator 2510 (Eppendorf) a un voltaje de 1,8 KVolts. 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 PT4/pKD46 así construída se creció a 30 °C con agitación, hasta una DO<sub>600</sub> de 0,4 en 20 ml de CL+Amp (100 µg/ml) y L-arabinosa (10 mM) para inducir la expresión de la recombinasa Red. Luego, se prepararon células electrocompetentes como ya se mencionó y se mezclaron 50 µl de bacterias con 10 µl de producto de PCR concentrado y dializado. Las bacterias transformantes se recuperaron en CL a 37 °C por 2 h para luego ser seleccionadas a 37 °C en placas de AL+Kan o AL+Cam, según correspondía. El plasmidio pKD46 se eliminó aislando sucesivamente las transformantes a 42°C. Finalmente, se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Kan o Cam que fueran sensibles a Amp.

El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante PCR utilizando partidores que hibridan en regiones externas al sitio del reemplazo. Se utilizaron: STM2899\_Out5 y STM2865\_Out3 para SPI-1; STM1393\_Out5 y STM1422\_Out3; STM3764\_Out5 y STM3752\_Out3 para SPI-3; STM4257\_Out5 y STM4262\_Out3 para SPI-4; STM1094\_Out5 y STM1087\_Out3 para SPI-5. Para confirmar el reemplazo alélico en las islas *SEN1001-SEN1002*, *SEN1971-SEN1999*, *SEN2144A-SEN2145B* y *SEN4290-SEN4292*, se utilizó un partidador externo a la región reemplazada en combinación con un partidador interno al “*cassette*” de resistencia utilizado; K1 para kanamicina y C3 para cloranfenicol, según correspondiera. Los partidores externos utilizados fueron: SEN1001\_Out5, SEN1002\_Out5, SEN1999\_Out5, SEN2145B\_Out5, SEN4292\_Out5 (Tabla 3). Como templado se utilizó 2 µl de la suspensión que resulta al resuspender una colonia en 80 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada. La reacción se hizo de la siguiente manera:

Tampón de PCR 5X	2	μl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	0,6	μl
dNTP's 10X [2 mM cada uno]	0,2	μl
Partidor 1 [10μM]	0,2	μl
Partidor 2 [10μM]	0,2	μl
Suspensión de bacterias	2	μl
H <sub>2</sub> O	4,7	μl
Taq ADN polimerasa [5 U/μl]	0,1	μl
Volumen final	10	μl

El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 3 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 50 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 1 min y 30 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). La amplificación se verificó mediante electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1%. Como control se realizó la reacción de amplificación utilizando como templado una suspensión de la cepa silvestre (Datsenko y Wanner, 2002).

## **2.7. Técnicas de Biología Molecular.**

### **2.7.1. Extracción de ADN genómico.**

Las cepas se cultivaron en 3 ml de CL suplementado con antibiótico cuando correspondiera durante toda la noche a 37°C en un agitador orbital. Se centrifugó 1,5 ml de cultivo por 2 min a 12.000 r. p. m. en una microcentrífuga Centrifuge 5417R (Eppendorf). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se sometió a la extracción de ADN genómico utilizando el kit "Gen Elute Bacterial Genomic DNA kit" (Sigma). Brevemente, se resuspendió el sedimento en 180 μl de solución de lisis T, se agregó 10 μl de RNasa A y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Luego se agregó 20 μl de proteinasa K a la suspensión, se agitó en vórtex y se incubó a 55°C por 30 min, una vez hecho esto se agregó 200 μl

de solución de lisis C, se agitó en vórtex y se incubó a 55°C por 10 min. Posteriormente se añadió 200 µl de etanol absoluto a las células ya lisadas y se agitó en vórtex. La mezcla obtenida se transfirió a columnas de purificación previamente lavadas con solución de preparación de columna y se centrifugó a 7.500 r. p. m. por 1 min. Se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector y se agregó 500 µl de solución de lavado O a la columna, la cual se sometió a centrifugación por 1 min a 7.500 r. p. m. Luego de esto, se eliminó el líquido recolectado, se agregó 500 µl de solución de lavado 1 a la columna y se sometió a centrifugación a 7.500 r. p. m por 1 min. Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector y se agregó 100 µl de solución de elución (1mM Tris-HCl pH 8,5) para someter a centrifugación, este proceso se realizó dos veces (Volumen total de 200 µl) y el ADN obtenido se mantuvo a 4°C hasta su uso.

### **2.7.2. Extracción de ADN plasmidial.**

Para la extracción de plasmidios con un alto número de copias se utilizó el kit “QIAprep Spin Miniprep” (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Finalmente, el ADN plasmidial se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

### **2.7.3. Electroforesis en geles de agarosa.**

Los geles se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0,8% y 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Las muestras de ADN a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de tampón Blue II 10X (glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno-cianol 0,25% (p/v), EDTA 0,1 M) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V constantes y luego el gel se tiñó por 5 min en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml). Las bandas de ADN se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

#### **2.7.4. Purificación de ADN de un gel de agarosa.**

Luego de la electroforesis y la tinción con bromuro de etidio, y utilizando una hoja de bistrú estéril, se cortaron las bandas de ADN a purificar desde el gel de agarosa. El ADN se extrajo usando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System kit” (Promega) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

#### **2.7.5. Digestión con enzimas de restricción.**

Las digestiones se realizaron utilizando los protocolos sugeridos por el proveedor (Fermentas).

Brevemente se utilizó la siguiente reacción:

H <sub>2</sub> O destilada estéril	11	μl
Tampón de <i>EcoRI</i> 10X	2	μl
ADN genómico	5	μl
Enzima <i>EcoRI</i>	1	μl
<hr/>		
Volumen final	19	μl

#### **2.7.6 Ensayos de Southern Blot**

##### **2.7.6.1 Digestión de ADN y transferencia a la membrana de nitrocelulosa.**

Se extrajo ADN genómico de 15 mutantes al azar pertenecientes a la genoteca de mutantes generada según lo descrito en el punto 2.6.3. Luego de analizar en un gel de agarosa la pureza del ADN extraído, se procedió a la digestión del mismo utilizando la enzima de restricción *EcoRI* (ver punto 2.7.7) y todos los productos de digestión se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa.

Una vez fotografiado el gel bajo luz UV, se despurinó el ADN por incubación del gel en dos volúmenes de HCl 0,25 N por 10 min a temperatura ambiente con agitación suave. Luego, el gel se lavó en un volumen de 100 ml de agua de alto grado de pureza para biología molecular y se desnaturalizó el ADN por incubación del gel en dos volúmenes de una solución que contenía NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M por 30 min. Posteriormente, se lavó el gel dos veces por 5 min en solución de transferencia SSC 5X (NaCl 0,75 M, Citrato de Sodio 75 mM, pH 7,5) / NaOH 10mM. La transferencia del ADN desde el gel a una membrana de Nylon se realizó por capilaridad durante toda la noche acorde a técnicas estándar utilizando solución de transferencia como solvente. Una vez completa la transferencia, se lavó la membrana por 5 min en tampón SSC 5X y se colocó en un papel filtro por 2 a 4 min. Por último, se fijó el ADN a la membrana usando un transiluminador UV.

#### **2.7.6.2 Pre-hibridación y marcaje de la sonda**

La prehibridación de la membrana se realizó en un baño termostático a 42°C durante toda la noche, por inmersión de la membrana en 6 ml de solución de hibridación con formamida proveniente del kit "HRP Southern blotting kit" (KPL) con agitación suave constante. Para generar la sonda marcada con biotina, se utilizó como molde un producto de PCR purificado de aprox 800 pb correspondientes al "cassette" de resistencia a kanamicina presente en el transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> utilizando los primarios KAN-2(F) y KAN-2(R) mediante PCR con el kit "PCR DNA Biotinylation kit" (KPL) siguiendo la siguiente reacción:



H <sub>2</sub> O destilada estéril	27,7	μl
Mix de marcación 10X	5	μl
Tampón de PCR 5X	10	μl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	4	μl
Partidor Kan-2(F)	1	μl
Partidor Kan-2(R)	1	μl
Taq polimerasa	0,3	μl
ADN Templado	1	μl
<hr/>		
Volumen final	50	μl

El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 3 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 50 seg; 55 °C x 30 seg; 72°C x 1 min y 30 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). La amplificación se verificó mediante electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1%. Como control, se realizó la reacción de amplificación utilizando como templado ADN genómico de la cepa silvestre.

El producto de la reacción se purificó desde el gel de agarosa siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.7.4. Para la hibridación, la sonda marcada se desnaturalizó a 95°C por 10 min y se colocó en hielo de forma inmediata. Luego, se incubó la membrana con la sonda purificada en solución de hibridación por 24 h a 42°C con agitación constante. Pasado el tiempo de hibridación con la sonda marcada, se lavó la membrana con soluciones de SSPE 2X (0,3M NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM EDTA, pH 7,4) y SDS 0,1% a temperatura ambiente.

Para la reacción de detección por quimioluminiscencia, se agregó solución de bloqueo proveniente del kit "HRP Southern blotting kit" (KPL) en conjunto con un conjugado de peroxidasa-estreptoavidina y se incubó por 45 min. Luego de esto, se transfirió la membrana a un recipiente limpio y se lavó sucesivas veces con solución de lavado de biotina 1X proveniente del kit ya mencionado y se

incubó por 1 min en presencia del sustrato quimioluminiscente LumiGLO. Finalmente, la membrana se expuso a un film fotográfico (Thermo Scientific CL-XPosure) durante toda la noche.

## **2.8 “Microarreglo” de ADN**

### **2.8.1 Preparación de las muestras para “microarreglo” de ADN**

Se extrajo ADN genómico bacteriano proveniente de la genoteca de mutantes cultivada *in vitro* que luego se inoculó en ratones BALBc (ver ensayos de colonización *in vivo*, punto 2.10.1) para su utilización como referencia (muestra “input”) y de las mutantes recuperadas desde los órganos extraídos (muestra “output”). Para esto, los órganos se homogenizaron en 3 ml de PBS estéril. Una alícuota de 100  $\mu$ l de homogenizado se utilizó para evaluar el número total de bacterias por órgano mediante recuento de las ufc en placas de AL+Kan cultivadas toda la noche a 37°C. El volumen restante se inoculó en 50 ml de CL+Kan y se incubó a 37°C durante toda la noche en un agitador orbital. Las bacterias presentes en cada homogenizado se centrifugaron, el sedimento se lavó y se resuspendió en aproximadamente 1 ml de PBS estéril y se utilizaron 100  $\mu$ l de suspensión para la extracción de ADN genómico como se detalló anteriormente (punto 2.7.1). El sedimento restante se mantuvo congelado a -80°C para su posterior uso.

Muestras de 4  $\mu$ g del ADN obtenido se llevaron a un volumen de 300  $\mu$ l en buffer Tris 1mM pH 8,0 y se sonicó con el fin de obtener fragmentos con un tamaño promedio de 1 kb. El ADN fragmentado se purificó utilizando el kit “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen) y se cuantificó mediante lectura espectrofotométrica utilizando el equipo Nano Drop ND-1000. Se empleó 1,5  $\mu$ g de ADN fragmentado como templado para una reacción de poliadenilación en el extremo 3’ según la siguiente reacción:

---

ADN sonicado [1,5 µg]	x	µl
Tampón 4 NEB 10X	10	µl
CoCl <sub>2</sub> [2.5 mM]	5	µl
dATP [10mM]	2	µl
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Completar a 36	µl
Transferasa Terminal [NEB, 20U/µl]	2	µl
Volumen final	50	µl

Esta mezcla de reacción se incubó 30 min a 37°C y luego por 10 min a 70°C, finalizando con el enfriamiento de las muestras a 4°C utilizando un termociclador GeneAmp PCR system 9700 marca Perkin Elmer.

Al producto resultante se le agregó 55 µl de agua libre de nucleasas y se purificó utilizando el kit “QIAquick PCR Purification kit” (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante. El ADN se eluyó en 45 µl de agua libre de nucleasas y se midió la concentración y pureza mediante lectura espectrofotométrica utilizando el equipo Nano Drop ND-1000.

Con el fin de amplificar las zonas fragmentadas adyacentes a la inserción del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Epicentre), 50 ng del producto de la poliadenilación se utilizaron como templado para una reacción de PCR empleando un partidor que hibrida en una zona del transposón (partidor DOPR2) y un segundo partidor poli-dT (partidor CCT<sub>24</sub>VN) que hibrida en la zona poliadenilada según la siguiente reacción:

ADN templado [50 ng]	x	μl
Partidor CCT <sub>24</sub> VN [10 μM]	0,5	μl
Partidor DOPR2 [10 μM]	0,5	μl
dNTPs 10x [2 mM cada uno]	2,5	μl
Tampón de PCR 10X	2,5	μl
Taq ADN polimerasa [5 U/μl]	0,25	μl
Agua libre de nucleasas	Completar a 17,75	μl
Volumen final	25	μl

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 1 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 10 seg; 50°C x 10 seg; 72°C x 5 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 3 min).

Para aumentar la cantidad de ADN obtenido, se procedió a realizar una reacción de PCR anidado utilizando como templado el producto de PCR anterior y empleando un partidor que hibrida en una zona más interna del transposón (partidor KAN2FP1-B) y nuevamente el partidor CCT<sub>24</sub>VN según la siguiente reacción:

ADN Templado	1	μl
Partidor CCT <sub>24</sub> VN [10 μM]	1	μl
Partidor KAN2FP1-B [10 μM]	1	μl
dNTPs 10x [2 mM cada uno]	5	μl
Tampón de PCR 10X	5	μl
Taq ADN polimerasa [5 U/μl]	0,5	μl
Agua libre de nucleasas	36,5	μl
Volumen final	50	μl

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 1 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 10 seg; 50°C x 10 seg; 72°C x 5 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 3 min).

### **2.8.2 Transcripción *in vitro***

Para obtener una mejor señal en la hibridación se realizó una reacción de transcripción *in vitro* utilizando el kit "AmpliScribe T7 Transcription Kit" (Epicentre) y el producto del PCR anidado como templado según la siguiente reacción:

Agua libre de RNasa	3	μl
Tampón T7 10x	2	μl
ATP [100 mM]	1,5	μl
CTP [100 mM]	1,5	μl
GTP [100 mM]	1,5	μl
UTP [100 mM]	1,5	μl
DTT [100 mM]	2	μl
ADN templado	5	μl
Solución de enzima T7 RNA polimerasa	2	μl
<hr/>		
Volumen final	20	μl

La mezcla de reacción se realizó a temperatura ambiente. Luego se incubó por 3 h a 37°C, Luego, se agregó 1 μl de DNasa I libre de RNasa, se homogenizó suavemente con pipeta, y se incubó a 37°C por 1 h. Luego, el ARN obtenido se resuspendió en un volumen final de 100 μl para ser purificado utilizando el kit "RNeasy-mini kit" (Qiagen), eluyendo dos veces en 30 μl de agua libre de nucleasas, y cuantificado por lectura espectrofotométrica.

### **2.8.3 Generación de cADN marcado por incorporación de Cy5/Cy3-dCTP**

Para la marcación del ARN por síntesis de cADN con incorporación de los fluróforos Cy5/Cy3-dCTP, se utilizaron 30 μl de ARN de cada muestra a hibridar. A esto se agregó 2 μl de hexámeros al azar N6 (2 μg/μl), se mezcló suavemente con pipeta y se incubó exactamente 10 min a 70°C. Luego, se

colocaron los tubos en hielo y se añadió 4  $\mu$ l del dCTP conjugado al fluoróforo Cy3 o Cy5, según corresponda (25nM), mezclando suavemente. Las muestras de referencia y las muestras experimentales se marcaron en determinados experimentos con fluoróforos distintos (“*dye swap*”). Esto se realizó para evitar errores en el análisis posterior de los datos debido a diferencias en la cinética de incorporación de Cy3-dCTP y Cy5-dCTP.

A las muestras obtenidas, se agregó 26  $\mu$ l de la siguiente mezcla de reacción y se mezcló suavemente con pipeta el contenido del tubo:

DTT [0.1M]	6	$\mu$ l
Solución tampón 5x para Superscript II	12	$\mu$ l
Mix de nucleótidos [25 mM dATP, dTTP, dGTP / 10mM dCTP]	1,2	$\mu$ l
Superscript II (Transcriptasa reversa)	4	$\mu$ l
Rnasin (Inhibidor de RNasa)	2	$\mu$ l
Agua libre de nucleasas	0,8	$\mu$ l
<hr/>		
Volumen final	26	$\mu$ l

La reacción se incubó a 42°C por 1h, luego de lo cual se agregó 2  $\mu$ l más de la enzima Superscript II (Invitrogen) y se mezcló suavemente con pipeta. Seguidamente, se incubó la reacción a 42°C por 1h y se agregó 3  $\mu$ l de NaOH 1 M mezclando suavemente. Se incubó a 70°C por 10 min y finalmente se añadió 3  $\mu$ l de HCl 1 M. El cADN marcado se purificó utilizando el kit “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen), eluyendo en un volumen final de 60  $\mu$ l y se utilizó para la hibridación en el “microarreglo”.

#### **2.8.4 Pre-hibridación e hibridación del “microarreglo”.**

Para la prehibridación de las muestras, se lavaron los “microarreglos” por 2 min en SDS 0,1% y posteriormente se enjuagaron dos veces en agua libre de nucleasas por 2 min. Luego de esto, se incubaron los “microarreglos” en solución de prehibridación (formamida 25%, SSC 5X, SDS 0,1%, BSA 0,1 mg/ml) por 45 min a 42°C utilizando un horno de hibridación. Posteriormente, los “microarreglos” se lavaron dos veces en agua libre de nucleasas por 2 min para eliminar los restos de SDS y se secaron por centrifugación por 10 min.

Para la hibridación, se evaporó el agua del volumen total de cADN mediante “*speed-vac*”. Una vez concentrado, se resuspendió el cADN marcado en 20 µl de agua libre de nucleasas, luego se mezclaron las muestras (“input” y “output”) marcadas con distintos fluróforos y se agregó un volumen de 40 µl de solución de hibridación 2x (formamida 50%, SSC 10X, SDS 0,2%). Esta mezcla final se incubó a 100°C por 5 min en un baño de agua. Luego, se centrifugó la muestra 30 seg para recolectar la condensación y se dejó enfriar a temperatura ambiente por algunos minutos.

El “microarreglo” se introdujo en una cámara de hibridación (Corning) y se puso un cubreobjeto (“Lifterslip”) en la parte superior. Luego, se cargó la muestra por capilaridad sobre la superficie del “microarreglo”, evitando la formación de burbujas bajo el cubreobjeto, se cerró herméticamente la cámara de hibridación y se incubó durante toda la noche a 42°C en un baño termorregulado.

Posterior a la hibridación, se lavaron los “microarreglos”. Para esto, se desensambló la cámara de hibridación y se removió el cubreobjeto por inmersión del “microarreglo” en una solución de SSC 2X y SDS 0,1% a 42°C. Luego de esto, se lavó en una solución de SSC 2X y SDS 0,1% a 42°C por 5 min y

luego en una solución de SSC 0,1X y SDS 0,1% por 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados sucesivos en SSC 0,1X por 1 min a temperatura ambiente y se enguajó en agua destilada por 10 seg. Por último, los “microarreglos” se secaron por centrifugación para proceder a la detección de la señal de hibridación en ambos canales (Cy3 y Cy5), utilizando el equipo láser ScanArray 5000 y el programa ScanArray 3.0.

### **2.8.5 Análisis de los resultados**

Las intensidades de las señales obtenidas en los “microarreglos” de ADN se cuantificaron utilizando el programa QuantArray 3.0 (Packard BioChip Technologies).

Los datos obtenidos se normalizaron y analizaron utilizando las herramientas estadísticas de Limma implementadas en Webarray: <http://bioinformatics.skcc.org/webarray>

### **2.9 “Genetic Footprinting”**

Con el fin de comprobar los fenotipos observados en los experimentos de “microarreglo”, se realizó un análisis de las muestras por “genetic footprinting”. Este análisis permite detectar y localizar inserciones individuales del transposón utilizado para la mutagénesis dentro de regiones cromosomales específicas. Para esto, se diseñaron partidores de 20 pb correspondientes a los extremos 5’ o 3’ de los genes pertenecientes a la zona a analizar. La amplificación de las inserciones del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> se realizó empleando como templado una dilución que contenía aproximadamente 50 ng/μl de ADN proveniente de las genotecas recuperadas desde los órganos analizados en los experimentos de “microarreglo”. Se utilizó el partidor SEN2144A\_Out5 y el partidor MEKAN-2B que hibrida en una zona interna del transposón según la siguiente reacción de PCR:



Tampón de PCR 5X	4	μl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,2	μl
dNTP's 10X [2 mM cada uno]	0,4	μl
Partidor MEKAN-2B [10μM]	0,4	μl
Partidor 2 [10μM]	0,4	μl
ADN [~50 ng/μl]	1,5	μl
H <sub>2</sub> O	11,9	μl
Taq ADN polimerasa [5 U/μl]	0,2	μl
Volumen final	20	μl

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (94°C x 3 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 58°C x 30 seg; 72°C x 4 min) y un ciclo de elongación final (72°C x 7 min). La amplificación se verificó mediante electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1%. Como control negativo se realizó la reacción de amplificación utilizando ADN proveniente de la cepa silvestre y de una mutante caracterizada con una inserción al azar. Como control positivo se utilizó ADN proveniente de la genoteca cultivada *in vitro* y utilizada como "input" en los ensayos de colonización *in vivo*.

## 2.10 Ensayos de virulencia *in vivo*

### 2.10.1 Ensayos *in vivo* de colonización de órganos internos en ratones BALB/c

Una alícuota de la genoteca de transposones se utilizó para inocular 50 ml de CL+Kan (50 μg/ml). Se incubó el cultivo con agitación a 37°C durante toda la noche, luego de lo cual las bacterias se centrifugaron y lavaron en PBS estéril. Una dilución en PBS estéril del cultivo conteniendo ~10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (ufc) se inoculó por vía intraperitoneal (IP) en 6 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida. Dos días después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se

les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Los órganos se homogenizaron en 3 ml de PBS estéril. Una alícuota de 100 µl de homogenizado se utilizó para evaluar el número total de mutantes que colonizaban cada órgano, mediante diluciones seriadas y recuento de las ufc en placas de AL+Kan (50 µg/ml) cultivadas toda la noche a 37°C. El homogenizado restante se inoculó en 50 ml de CL+Kan (50 µg/ml) y se incubó con agitación a 37°C durante toda la noche, luego de lo cual las bacterias se centrifugaron. El sedimento se resuspendió en aproximadamente 1 ml de PBS estéril y se utilizaron 100 µl de esta suspensión para la extracción de ADN genómico como se detallo anteriormente. El sedimento restante se congeló a -20°C para su posterior uso (Modificación del metodo descrito por Chan y cols, 2005).

### **2.10.2 Ensayos de competencia *in vivo* en ratones BALB/c**

Las mutantes a ensayar se cultivaron con agitación a 37°C durante toda la noche en CL+Kan (50 µg/ml) o CL+Cam (20 µg/ml), según correspondiera. En paralelo, se realizó el mismo procedimiento con la cepa silvestre. Luego de esto, las bacterias se centrifugaron y lavaron con PBS estéril. Se inoculó por vía intraperitoneal (IP) en 6 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida una dilución en PBS conteniendo  $10^4$  ufc de una mezcla en proporción 1:1 de bacterias mutantes y silvestre. Diluciones seriadas en PBS estéril de la mezcla inoculada se sembraron en placas de AL y AL+Kan (50 µg/ml) o AL+Cam (20 µg/ml), según correspondiera. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C para obtener el recuento inicial de bacterias totales y bacterias mutantes respectivamente. Dos días después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Los órganos se homogenizaron en 3 ml de PBS estéril y 100 µL del homogenizado se utilizaron para realizar diluciones seriadas en PBS estéril las que se sembraron en placas de AL y AL+Kan (50 µg/ml) o AL+Cam (20 µg/ml), según correspondiera. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C para obtener el

recuento final de bacterias totales y bacterias mutantes respectivamente. Con los valores de ufc obtenidos se calculó un índice de competencia (IC) según la siguiente fórmula:

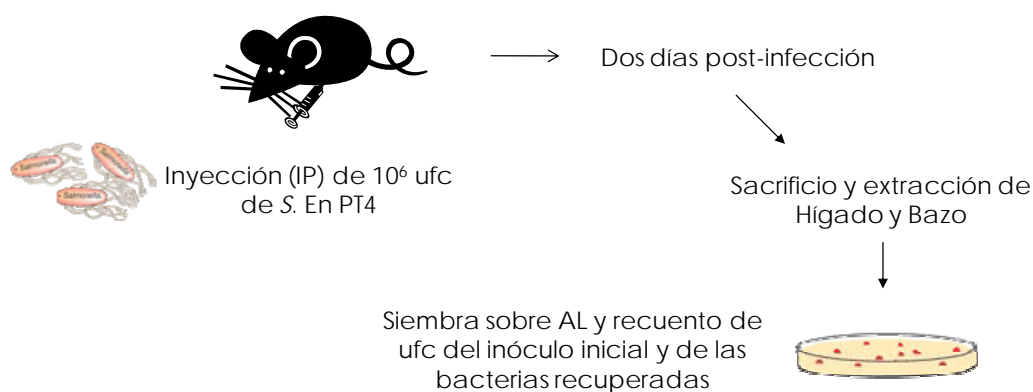
$$IC = \frac{(ufc_{silvestre}/ufc_{mutante})_{iniciales}}{(ufc_{silvestre}/ufc_{mutante})_{finales}}$$

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis es capaz de colonizar hígado y bazo de ratones BALB/c en ensayos de virulencia *in vivo*.

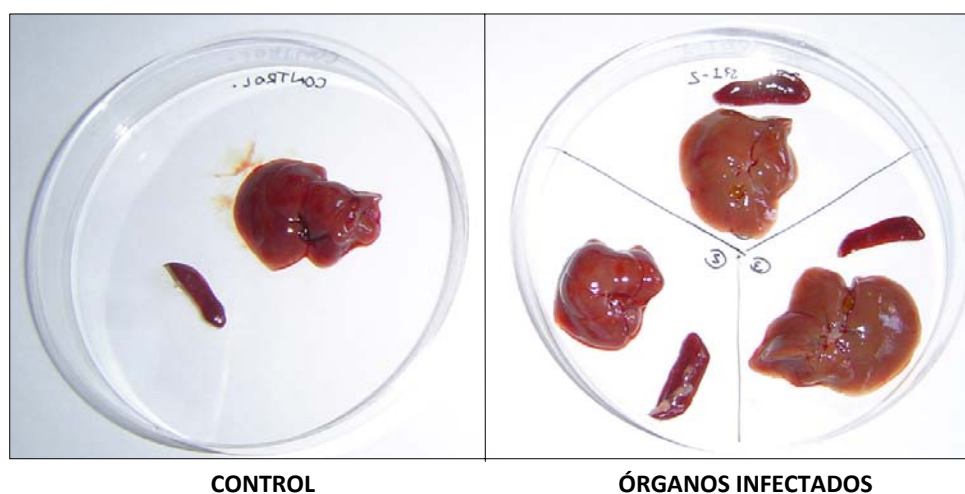
Estudios previos realizados por otros grupos de investigación, han demostrado la capacidad de *Salmonella* Typhimurium para colonizar órganos internos de ratones BALB/c en ensayos de virulencia *in vivo*. Este modelo ha sido utilizado comúnmente para estudiar los mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* (Lawley y cols., 2006; Chan y cols., 2005).

Con el fin de determinar el comportamiento de *S. Enteritidis* en ensayos de este tipo, se analizó la capacidad de la cepa de referencia PT4 para colonizar el hígado y el bazo de ratones BALB/c. Para esto, se inoculó intraperitonealmente (IP) 6 ratones BALB/c con una dilución de *S. Enteritidis* PT4 ( $10^6$  ufc) en PBS estéril. Dos días después de la inoculación, los animales se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo de manera aséptica (Figura 1).



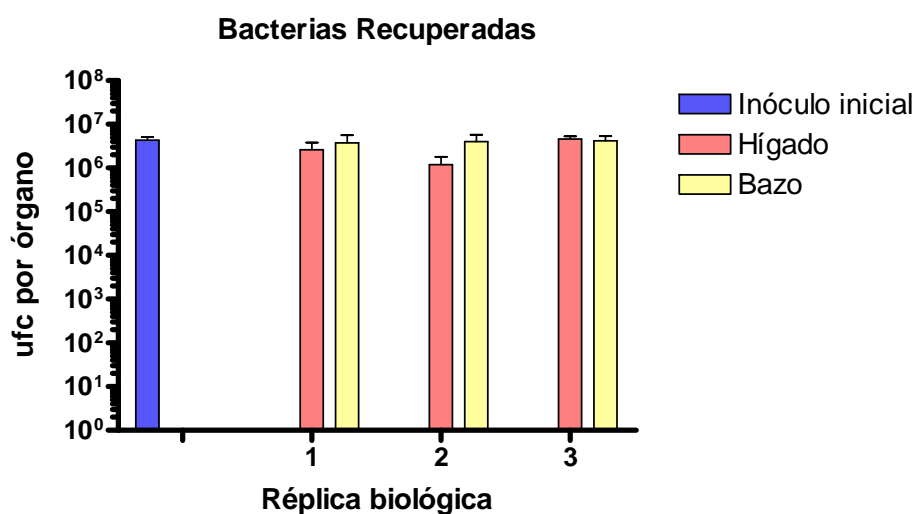
**Figura 1. Ensayo de virulencia *in vivo* en ratones BALB/c.** Esquema representativo del experimento de virulencia *in vivo* en ratones BALB/c por inoculación IP de  $10^6$  ufc de *S. Enteritidis* PT4.

Se observaron cambios en la morfología de los órganos extraídos desde los ratones inoculados con *S. Enteritidis* en comparación con órganos extraídos desde un ratón control inoculado con PBS estéril. En los órganos extraídos desde los ratones inoculados con bacterias se observó una importante esplenomegalia, mientras que el hígado presentó un leve aumento de tamaño en algunos casos. Por otra parte, no se observaron cambios en el color de los órganos ni la presencia de lesiones (Figura 2).



**Figura 2. Morfología de bazo e hígado de ratones BALB/c inoculados con *S. Enteritidis* PT4 en un ensayo de virulencia *in vivo*.** Fotografía representativa de hígado y bazo de ratones BALB/c control (izquierda) e inoculados con  $10^6$  ufc de bacteria (derecha).

Posteriormente, los órganos se homogenizaron y una alícuota del homogenizado se utilizó para realizar diluciones seriadas y sembrarlas en placas de AL para el recuento de ufc por órgano (Figura 3). La cantidad promedio de bacterias inoculadas fue de  $4,43 \times 10^6$  ufc. La cantidad de bacterias recuperadas se encontró en un intervalo de  $1,2$  a  $4,6 \times 10^6$  ufc desde hígado y desde bazo de  $3,8$  a  $4,2 \times 10^6$  ufc.



**Figura 3. Colonización de *S. Enteritidis* en bazo e hígado de ratones BALB/c *in vivo*.** El gráfico muestra valores de ufc totales inoculadas y de ufc recuperadas desde cada órgano. La barra vertical representa la desviación estándar obtenida en recuentos realizados por triplicado por órgano, en un total de tres ratones.

En conjunto, estos resultados indican que *S. Enteritidis* PT4 es capaz de colonizar bazo e hígado de ratones BALB/c en un modelo experimental *in vivo* y generar un cuadro de infección sistémica.

### 3.2. La estrategia de selección negativa analizada mediante “microarreglos” permite identificar genes involucrados en la enfermedad sistémica.

#### 3.2.1 Generación de una genoteca de mutantes al azar por inserción mediante el uso de transposones.

Se generó una colección de mutantes por inserción al azar del transposón comercial EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Epicentre) como se describió en Materiales y Métodos. Este transposón contiene un gen de resistencia a kanamicina, sitios de reconocimiento para la transposasa del Tn5 y un promotor T7 (Figura 4A). El protocolo completo de mutagénesis se realizó cuatro veces, hasta obtener aproximadamente 54.000 clones resistentes a kanamicina (Kan<sup>R</sup>) (Figura 4). Todas las colonias

obtenidas se resuspendieron en CL suplementado con glicerol con el fin de generar una genoteca de mutantes. Finalmente, la genoteca se dividió en alícuotas de 1 ml y se mantuvo congelada para su uso posterior.

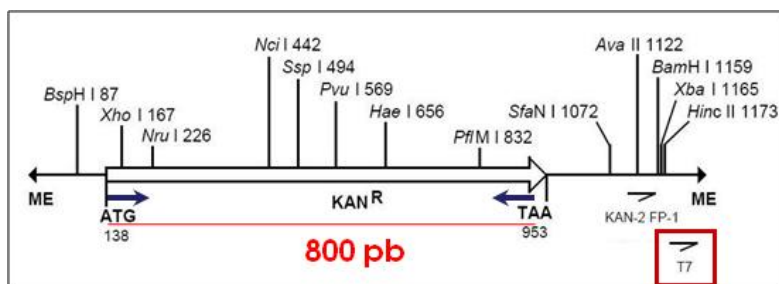
### **3.2.2 Análisis de fenotipos y genotipo de mutantes obtenidas al azar por inserción mediante el uso de transposones.**

Previo a la generación de la genoteca, se escogieron mutantes individuales de manera aleatoria para realizar diversos experimentos que dieran cuenta de una inserción al azar del transposón durante la mutagénesis. Estos experimentos incluyeron:

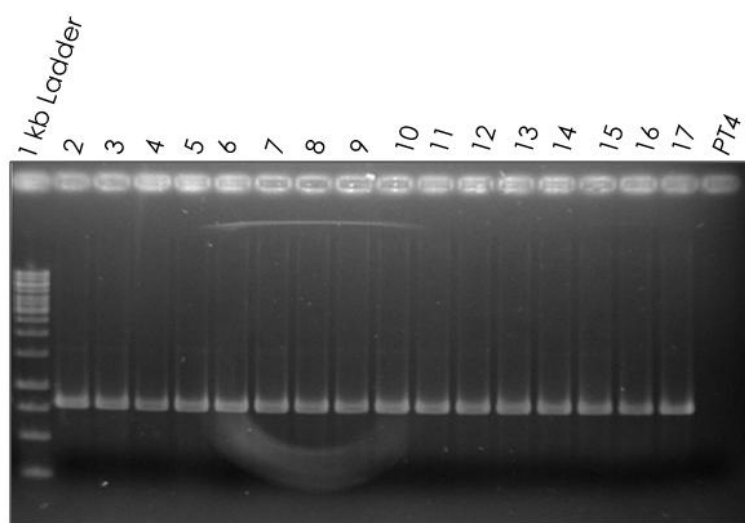
- (1) Detección del transposón por PCR.
- (2) Ensayo de Southern blot para determinar el número de inserciones obtenidas por mutante.
- (3) Detección de mutantes incapaces de crecer en medio mínimo (mutantes auxótrofos).
- (4) Detección de mutantes que presenten deficiencias en la producción de lipopolisacárido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

**Detección del transposón por PCR.** Con el fin de comprobar que la mutagénesis realizada fue al azar, primero se detectó la inserción del transposón mediante PCR en el genoma de 15 mutantes escogidas aleatoriamente. El producto de amplificación correspondió al gen de resistencia a kanamicina contenido en el transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Figura 4).

(A)



(B)

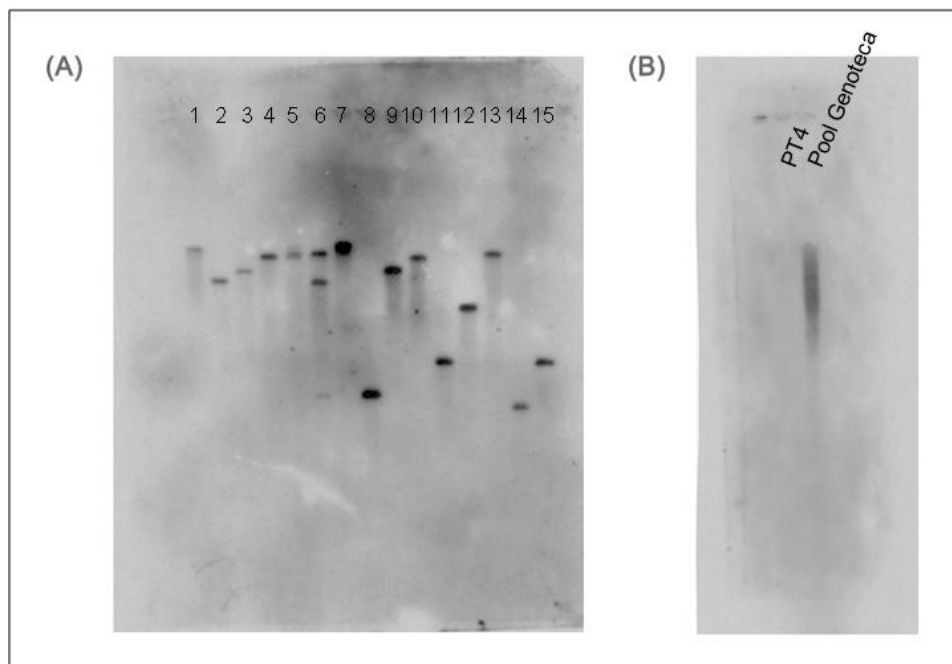


**Figura 4. Detección de la presencia del transposón mediante PCR.** (A) La figura muestra las principales características del transposón EZ-Tn5<sup>TM</sup>  $\langle T7/KAN-2 \rangle$  (Epicentre). La zona demarcada en azul es el producto amplificado por la reacción de PCR utilizando los partidores KAN-2(F) y KAN-2(R) (ver Materiales y Métodos punto 2.4). El fragmento posee un tamaño aproximado de 800 pb. (B) Gel de agarosa al 1% que contiene el producto amplificado por PCR de 15 mutantes seleccionadas al azar. Carril 1: Ladder de 1 KB Gene Ruler; Carril 2-16 Mutantes número 1 al 15; Carril 17: control positivo de la reacción utilizando el cassette de kanamicina como templado (pCLF4); Carril 18: control negativo de la reacción utilizando ADN genómico de la cepa silvestre como templado.

**Análisis mediante Southern blot.** Para verificar el número de inserciones obtenidas por genoma en cada mutante y que las inserciones obtenidas fueron al azar, se realizó un Southern blot utilizando ADN proveniente las mutantes analizadas mediante PCR, de la cepa silvestre (control negativo) y de la genoteca de mutantes (control positivo). Para esto, el ADN genómico de las mutantes seleccionadas y de los controles se digirió con la enzima de restricción *Pst*I, la cual no corta dentro de la secuencia del transposón. Para generar la sonda marcada con biotina se utilizó como templado un producto de PCR



purificado de aprox 800 pb correspondientes al gen de resistencia a kanamicina presente en el transposón y los partidores KAN-2(F) y KAN-2(R). Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 5.



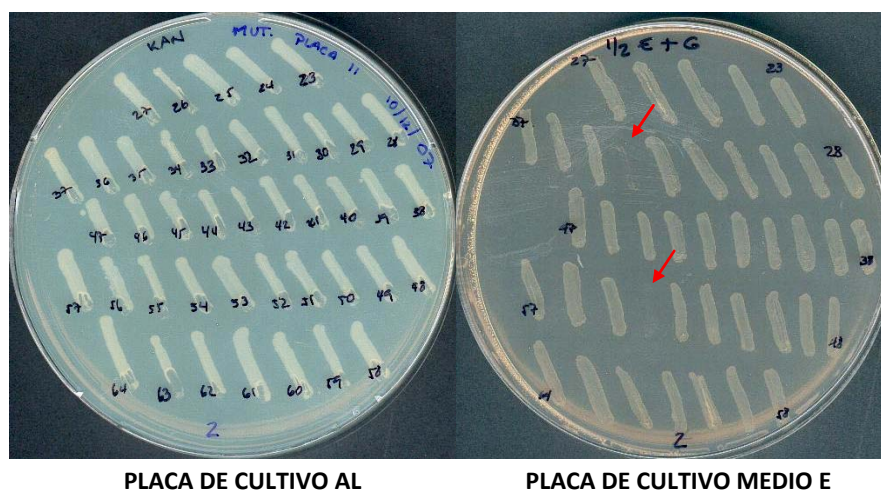
**Figura 5. Southern Blot de mutantes seleccionadas desde la genoteca de mutantes por inserción al azar del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2>. (A)** Detección de inserciones en ADN obtenido de 15 mutantes seleccionadas al azar **(B)** Detección de inserciones en ADN obtenido de la cepa silvestre PT4 (control negativo) y en ADN obtenido de una muestra de la genoteca de mutantes (control positivo).

Como se muestra en la Figura 5, en las quince mutantes seleccionadas al azar se observa la presencia del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2>. Las bandas detectadas poseen distintos tamaños, indicando que la inserción del transposón ocurrió en distintas regiones del cromosoma. En 14 de las mutantes se observó sólo una banda, indicando la presencia de inserciones únicas del transposón en cada caso. En sólo una mutante se observó la presencia de tres bandas (carril 6). Esto podría deberse a algún tipo de contaminación entre las muestras, debido a que el tamaño de estas bandas coincide con

las observadas en otras mutantes. Alternativamente, en el caso de esta mutante ocurrió más de una inserción.

**Detección de mutantes auxótrofos.** Con el fin de caracterizar la mutagénesis al azar se analizaron fenotipos fácilmente identificables en la población de mutantes generadas. Uno de ellos es la presencia de mutantes auxótrofos; mutantes nutricionales incapaces de crecer en medio mínimo. Para esto, se escogieron de manera aleatoria 248 colonias provenientes de la mutagénesis y se replicaron en placas de AL+Kan (medio rico) y en placas de medio mínimo E suplementado con glucosa como fuente de carbono.

De las 248 colonias analizadas, 5 fueron incapaces de crecer en medio mínimo en comparación a las placas de medio rico (12, 34, 54, 197 y 223). Es decir, se obtuvo aproximadamente un 2% de mutantes auxótrofos dentro de la genoteca generada (Figura 6).

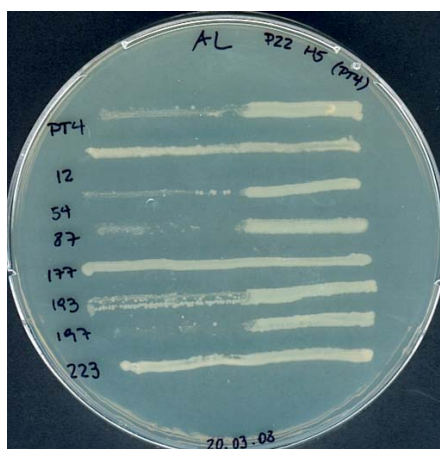


**Figura 6. Comparación del crecimiento de colonias obtenidas de la genoteca en medios de cultivo AL y mínimo E.** Fotografía representativa de placas sembradas con colonias obtenidas desde la genoteca cultivadas paralelamente en medio rico, AL (izquierda) y medio mínimo E suplementado con 0,2% de glucosa (derecha). Las flechas rojas indican las mutantes que fueron incapaces de crecer en medio mínimo E, es decir mutantes auxótrofos.

**Detección de mutantes que presentan deficiencias en la producción de lipopolisacárido (LPS).** Se analizó la producción de LPS mediante ensayo de sensibilidad al fago P22 H5 y por análisis del perfil electroforético de preparaciones de LPS obtenidas de algunas de las 248 mutantes replicadas que presentaron fenotipo rugoso.

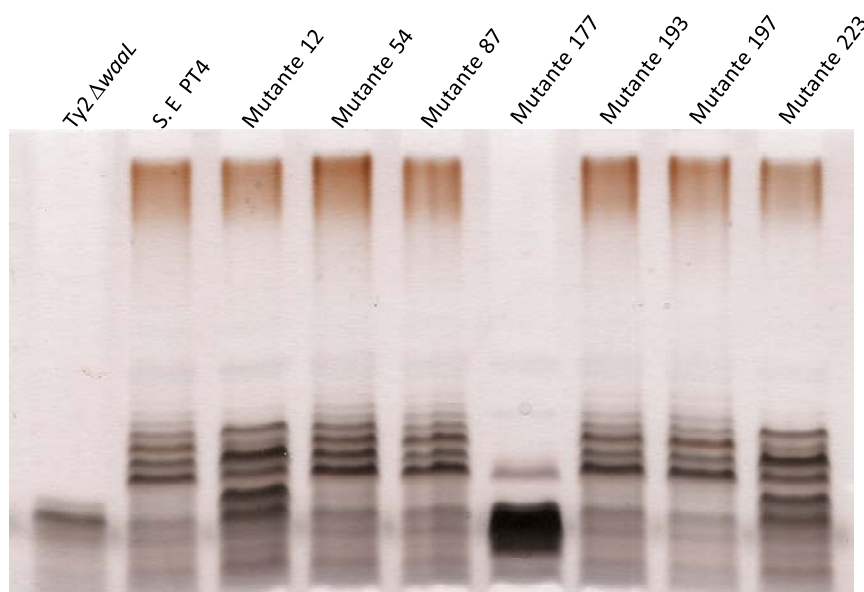
El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativo, abarcando cerca del 75% de su superficie. Esta macromolécula juega un rol estructural estabilizando la membrana externa y además constituye un importante factor de virulencia, fundamental en la interacción con el hospedero. El LPS está formado por tres dominios unidos covalentemente: el lípido A anclado a la membrana externa; el “core” de oligosacáridos, ubicado en la parte media y el Antígeno O (AgO), formado por unidades repetidas de oligosacáridos, el cual se proyecta hacia el exterior de la célula (Raetz y Whitfield, 2002).

Por otra parte, P22 es un bacteriófago temperado que infecta a *Salmonella* y su receptor se encuentra en el AgO del LPS. De esta manera, las cepas que posean un LPS intacto podrán ser infectadas y lisadas por la variante H5 del fago P22 (variante lítica del fago), en cambio, las que posean deficiencias ya sea en la síntesis o polimerización del LPS resultando en una carencia de AgO serán resistentes a la infección del fago (mutante rugosa). Para analizar la sensibilidad de las mutantes escogidas al fago P22, se trazó una línea ecuatorial sobre una placa de AL con un lisado del fago P22 H5 propagado en la cepa *S. Enteritidis* PT4. Las cepas a ensayar (mutantes 12, 54, 87, 177, 193, 197 y 223) se sembraron trazando una línea que cruzara en forma perpendicular a la del lisado (“*cross streaking*”). Luego de incubar durante toda la noche, 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 (Figura 7).



**Figura 7. Ensayo de sensibilidad al fago lítico P22 H5 para mutantes escogidas de manera aleatoria.** Fotografía representativa de la placa en la cual se realizó la estrategia experimental de “*cross streaking*”. De manera vertical se distribuye un lisado del fago lítico P22 H5 y de forma perpendicular a éste (de derecha a izquierda) se sembraron las cepas seleccionadas.

Como se observa en la Figura 7, tres cepas fueron resistentes a la lisis por el fago P22 H5 (mutantes 12, 177 y 223). Esto indicaría que dichas mutantes no poseerían un LPS completo y carecerían de AgO. Para confirmar los resultados obtenidos, se analizó la producción de LPS en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina teñidos con plata y se comparó con el perfil electroforético de preparaciones de LPS obtenidas desde las mutantes 12, 177 y 223, la cepa silvestre *S. Enteritidis* PT4 y de una mutante rugosa de *S. Typhi* que carece de la ligasa del AgO (Figura 8).



**Figura 8. Análisis del perfil electroforético de preparaciones de LPS obtenidas a partir de mutantes escogidas de manera aleatoria.** Fotografía representativa del perfil electroforético del LPS de las mutantes número 12 (carril 3), 54 (carril 4), 87 (carril 5), 177 (carril 6), 193 (carril 7), 197 (carril 8), 223 (carril 9) utilizadas en el experimento de “*cross streaking*”. Como controles se utilizó la cepa silvestre *S. Enteritidis* PT4 que presenta un AgO completo (Carril 2) y la mutante Ty2  $\Delta waaL$ , una mutante rugosa que posee deficiencias en la ligación de la cadena del AgO (Carril 1)

Como se observa en la Figura 8, sólo la mutante 177 no produce AgO. En cambio, las mutantes 12 y 223 poseen un LPS completo al igual que la cepa silvestre. La resistencia de estas cepas a la acción lítica del fago P22 H5 podría explicarse debido a que en ellas se observó la formación de una capa mucosa, la cual podría dificultar el acceso del fago a su receptor en el LPS.

### **3.2.3 Ensayo de colonización *in vivo* de órganos internos en ratones BALB/c usando una genoteca de mutantes al azar por la inserción de un transposón.**

Una alícuota de la genoteca de transposones se utilizó para inocular 50 ml de CL+Kan. Se incubó el cultivo con agitación a 37°C durante toda la noche, luego de lo cual las bacterias se centrifugaron y lavaron con PBS. Una dilución en PBS del cultivo conteniendo  $\sim 10^6$  ufc se inoculó por

vía IP en 6 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida. Dos días después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el hígado y el bazo en forma aséptica. Luego, se homogenizaron los órganos en PBS estéril y una alícuota de 100  $\mu$ l de homogenizado se utilizó para evaluar el número total de bacterias por órgano mediante recuento de las ufc en placas de AL+Kan. La cantidad promedio de bacterias inoculadas fue de  $4,2 \times 10^6$  ufc. La cantidad de bacterias recuperadas se encontró en un intervalo de  $2,2 \times 10^6$  a  $6,9 \times 10^7$  ufc desde hígado y de 2,0 a  $6,6 \times 10^6$  ufc desde bazo (Figura 9).

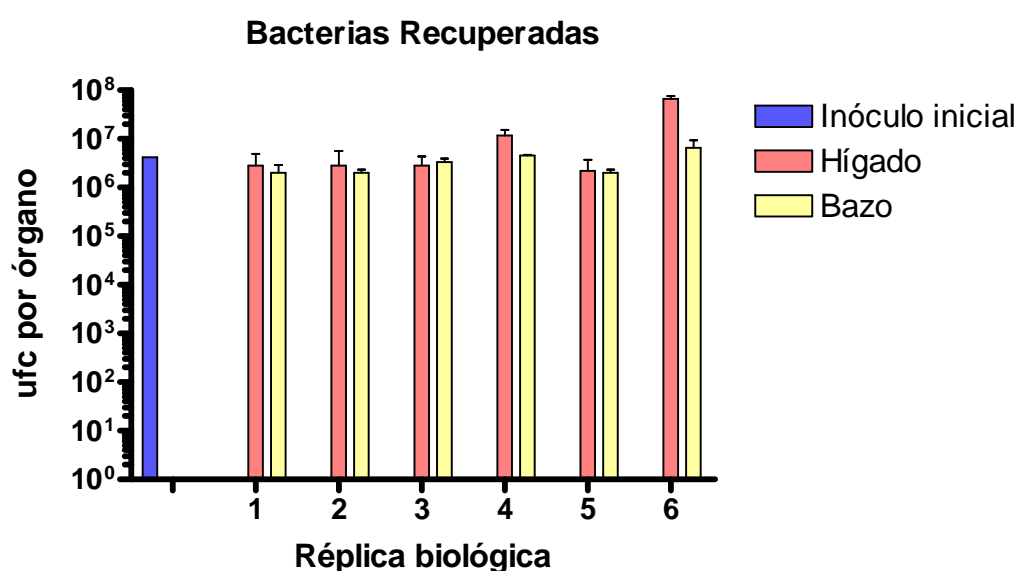
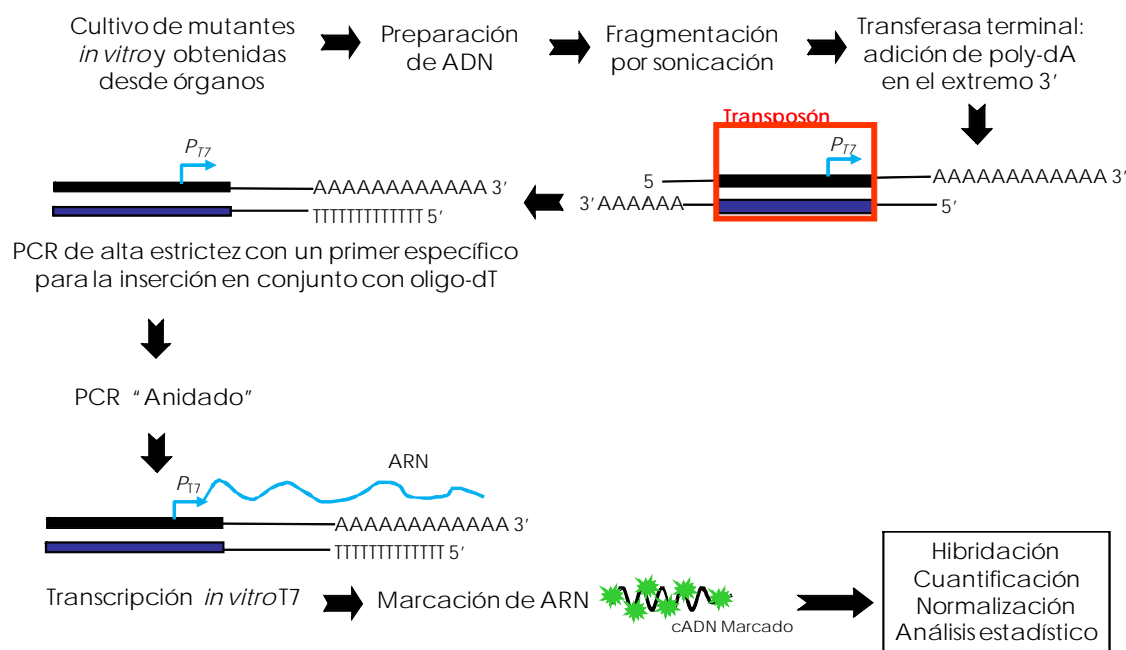


Figura 9. Colonización de la genoteca de mutantes de *S. Enteritidis* en bazo e hígado de ratones BALB/c *in vivo*. El gráfico muestra valores de ufc totales recuperadas en cada órgano e inóculo inicial. La barra vertical representa la desviación estándar obtenida en recuentos realizados, por triplicado por órgano, en un total de seis ratones.

### 3.2.4 Análisis global de mutantes de *S. Enteritidis* que presenten deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c por “microarreglos”

Se identificaron las mutantes presentes en la muestra inoculada de la genoteca y en las muestras recuperadas de cada órgano mediante el empleo de un “microarreglo” de ADN diseñado para

el estudio de diversos serovares de *Salmonella enterica* (Porwollik y cols., 2005). Estos experimentos se realizaron en base a modificaciones de protocolos descritos previamente en la literatura (Chan, 2005; Lawley 2006), diseñadas en el laboratorio del Dr. Michael McClelland (Sydney Kimmel Cancer Center, San Diego, CA, USA). Para realizar estos experimentos se utilizó el ADN genómico bacteriano proveniente de la genoteca inicial cultivada *in vitro* (muestra "input") que luego fue inoculada en ratones BALB/c para su utilización como referencia y el ADN de las mutantes recuperadas desde los órganos extraídos (muestra "output"). El procedimiento experimental de identificación se esquematiza en la Figura 10.



**Figura 10. Análisis global de mutantes de *S. Enteritidis* pertenecientes a una genoteca de transposones que presentan deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c.** Esquema representativo del protocolo utilizado para la identificación de genes necesarios para la virulencia de *S. Enteritidis* PT4 mediante el uso de "microarreglos".

Con el fin de evitar desviaciones en los resultados debidos a diferencias en la cinética de incorporación de los fluoróforos Cy5 y Cy3 durante la marcación de las muestras se realizó la técnica de “dye swap”. Ésta consiste en marcar de manera inversa las muestras a analizar, es decir utilizar Cy3 para el “input” y Cy5 para el “output”. Las intensidades de las señales obtenidas en los “microarreglos” de ADN se cuantificaron utilizando el programa QuantArray 3.0 (Packard BioChip Technologies). Los datos obtenidos se normalizaron y analizaron utilizando las herramientas estadísticas de Limma implementadas en Webarray (<http://bioinformatics.skcc.org/webarray>). Usando estos valores se calculó el índice “M”, que representa la razón de cambio entre la fluorescencia emitida para cada gen en estudio en la muestra “input” (In) versus la muestra “output” (Out) según la siguiente ecuación:

$$M = \text{Log}_2 (\text{Out}_1 / \text{Out}_{\text{total}}) - \text{Log}_2 (\text{In}_1 / \text{In}_{\text{total}})$$

En esta ecuación,  $\text{In}_1$  y  $\text{Out}_1$  corresponden a la fluorescencia emitida por el “spot” que representa al “gen 1” en la muestra “input” y “output”, respectivamente. Por su parte,  $\text{In}_{\text{total}}$  y  $\text{Out}_{\text{total}}$  corresponden a la fluorescencia total emitida por todos los “spots” en la muestra “input” y “output”, respectivamente. Así, un valor de  $M \leq -0,75$  indica que mutantes en el “gen 1” se están perdiendo de la población total de mutantes recuperadas desde cada órgano. Es decir, que presentan una capacidad disminuida de colonización. Un valor de  $M \geq 2$  corresponde a mutantes que se están ganando en la población. Es decir, que presentan una capacidad aumentada de colonización. Valores intermedios de M indican que estas mutantes no presentan cambios en la población durante el proceso de selección.

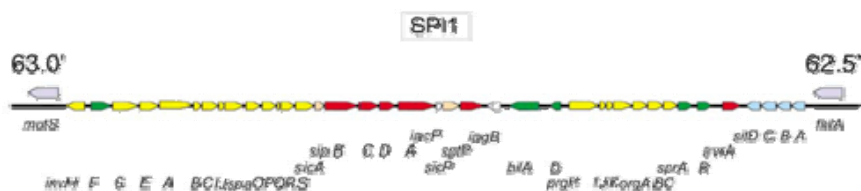
De los 4505 “spots” que representan 4298 genes de *S. Enteritidis* en el “microarreglo” utilizado (4239 genes presentes en el cromosoma y 59 genes presentes en el plasmidio de virulencia), se identificaron 3725 registros (3547 genes) con una intensidad de señal suficiente como para ser detectados. Según lo esperado, dentro de este grupo no se encontraron mutantes en genes



considerados como esenciales para la supervivencia de la bacteria. De los 3547 genes mencionados anteriormente, 698 presentaron diferencias significativas ( $M \leq -0,75$  y  $P \leq 0,01$ ) respecto a una muestra control en nuestros ensayos de colonización *in vivo*. Es decir, se consideran como necesarios para la virulencia de la bacteria cuando es administrada por vía intraperitoneal en ratones BALB/c. Ejemplos de estos genes son los involucrados en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos (*aroE*, *aroD*, *aroB*, *aroP*), genes involucrados en el metabolismo de purinas (*purF*, *purD*, *purB*, *purB*, *purR*, *purA*), genes que participan en la regulación de respuesta a estímulos externos (reguladores globales) (*phoP*, *phoQ*, *arca*, *arcB*, *envZ*, *fimZ*, *rpoN*, *crp*, *fur*), genes involucrados en el transporte de hierro (*feoB*, *sitD*), genes regulados por el regulón *phoP/Q* (*pagO*, *pqaA*, *pagD*), genes de los regulones y efectores de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 y genes involucrados en la biosíntesis del LPS (*rfaB*, *rfaG*, *rfaI*, *rfaJ*, *rfaL*, *rfbF*, *rfbH*, *rfbI*, *rfbK*, *rfc*), cuya implicancia en la virulencia de *Salmonella* se ha descrito ampliamente (Lawley y cols., 2006; Chan y cols., 2005).

Como resultado de este análisis se identificaron genes necesarios para la colonización de órganos internos en ratones BALB/c codificados en islas genómicas pertenecientes a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Dentro de este grupo, existen genes que no han sido anteriormente relacionados con patogenicidad, como genes que codifican: (i) un sistema de restricción modificación tipo I el cual protege a las bacterias de ADN foráneo, (ii) los componentes de una fimbria no descrita en la literatura, (iii) islas genómicas que por análisis bioinformático podrían codificar factores de virulencia hipotéticos. También se encontraron genes individuales y otros codificados en Islas de Patogenicidad conservados entre los distintos serovares de *Salmonella* representados en el “microarreglo” utilizado (Figura 11). Dentro de este último grupo cabe destacar los genes pertenecientes a la Isla de Patogenicidad 4, que codifica un sistema de secreción tipo I y su proteína efectora. Estos resultados demuestran un papel importante para estos genes en el modelo de colonización de órganos internos de ratón, el cual no se ha descrito para otros serovares del género *Salmonella*.

(A)



ORF	Gen	Función	Bazo (n=6)		Hígado (n=6)	
			M	P (sig. estad.)	M	P (sig. estad.)
SEN2703	sitA	Salmonella iron transporter: fur regulated	0,48	0,061509882	0,44	0,171018431
SEN2704	sitB	Salmonella iron transporter: fur regulated	-0,19	0,516669219	0,48	0,115894715
SEN2705	sitC	Salmonella iron transporter: fur regulated	0,47	0,016626968	-0,31	0,276696018
SEN2706	sitD	Salmonella iron transporter: fur regulated	<b>-2,67</b>	<b>1,06E-09</b>	<b>-1,29</b>	<b>3,55E-05</b>
SEN2707	avrA	putative inner membrane protein	<b>-0,81</b>	<b>0,000716301</b>	-0,33	0,062838657
SEN2708	sprB	transcriptional regulator	<b>-1,48</b>	<b>2,4443E-06</b>	<b>-0,83</b>	<b>0,0001231</b>
SEN2709	hilC	bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	<b>-2,38</b>	<b>1,20E-06</b>	<b>-1,41</b>	<b>7,54E-06</b>
SEN2710		putative cytoplasmic protein	-0,28	0,130766384	-0,04	0,845720855
SEN2711	orgA	putative flagellar biosynthesis/type III secretory pathway protein	<b>-0,92</b>	<b>5,08E-04</b>	<b>-1,00</b>	<b>3,69E-06</b>
SEN2712		putative inner membrane protein	-0,55	0,028024822	<b>-0,94</b>	<b>0,000227423</b>
SEN2713	prgK	cell invasion protein; lipoprotein, may link inner and outer membranes	<b>-1,15</b>	<b>8,78711E-05</b>	-0,38	0,072906733
SEN2714	prgJ	cell invasion protein; cytoplasmic	<b>-1,70</b>	<b>3,13E-06</b>	<b>-1,36</b>	<b>2,98E-05</b>
SEN2715	prgI	cell invasion protein; cytoplasmic	<b>-1,45</b>	<b>2,24E-05</b>	<b>-1,47</b>	<b>7,39E-06</b>
SEN2716	prgH	cell invasion protein	<b>-2,26</b>	<b>4,61E-10</b>	<b>-1,93</b>	<b>7,41E-11</b>
SEN2717	hilD	regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	<b>-1,33</b>	<b>7,32E-07</b>	<b>-1,35</b>	<b>2,63E-07</b>
SEN2718	hilA	invasion genes transcription activator	<b>-2,31</b>	<b>2,95E-11</b>	<b>-1,20</b>	<b>2,13E-06</b>
SEN2719	iagB	cell invasion protein	-0,24	0,36642425	-0,33	0,093699874
SEN2720	sptP	protein tyrosine phosphatase	-0,60	0,012613229	-0,25	0,122260292
SEN2721	sicP	chaperone, related to virulence	-0,59	0,054873818	-0,67	0,030625264
SEN2722	iacP	putative acyl carrier protein	-0,62	0,076128045	-0,64	0,022854694
SEN2723	sipA	cell invasion protein	-0,20	0,521248324	0,42	0,090539484
SEN2724	sipD	cell invasion protein	-0,74	0,01417976	-0,45	0,020556785
SEN2724	sipD	cell invasion protein	<b>-0,84</b>	<b>0,007542419</b>	<b>-0,88</b>	<b>0,00014376</b>
SEN2725	sipC	cell invasion protein	<b>-2,04</b>	<b>1,04E-08</b>	<b>-1,86</b>	<b>4,06E-08</b>
SEN2726	sipB	cell invasion protein	<b>-2,61</b>	<b>3,61E-10</b>	<b>-2,77</b>	<b>7,48E-10</b>
SEN2727	sicA	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-1,07</b>	<b>1,41E-03</b>	<b>-1,24</b>	<b>1,46E-07</b>
SEN2728	spaS	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-3,16</b>	<b>1,20E-10</b>	<b>-1,70</b>	<b>2,02E-07</b>
SEN2729	spaR	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-2,67</b>	<b>1,71E-07</b>	<b>-1,20</b>	<b>2,03E-05</b>
SEN2730	spaQ	surface presentation of antigens; secretory proteins	0,75	0,012610271	0,58	0,063803718
SEN2731	spaP	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-1,61</b>	<b>7,95E-08</b>	<b>-1,73</b>	<b>1,92E-07</b>
SEN2732	spaO	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-3,08</b>	<b>5,64E-09</b>	<b>-2,41</b>	<b>1,08E-09</b>
SEN2733	invJ	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-2,38</b>	<b>1,45E-08</b>	<b>-1,15</b>	<b>5,55E-05</b>
SEN2734	invI	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-1,22</b>	<b>0,00254588</b>	<b>-0,79</b>	<b>0,011846682</b>
SEN2735	invC	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-1,42</b>	<b>4,71E-06</b>	<b>-1,01</b>	<b>4,90E-05</b>
SEN2736	invB	surface presentation of antigens; secretory proteins	<b>-1,68</b>	<b>7,41806E-06</b>	<b>-0,97</b>	<b>0,000845617</b>
SEN2737	invA	invasion protein	<b>-3,16</b>	<b>5,44E-10</b>	<b>-1,72</b>	<b>7,87E-08</b>
SEN2738	invE	invasion protein	<b>-2,53</b>	<b>1,03E-11</b>	<b>-1,64</b>	<b>1,25E-09</b>
SEN2739	invG	invasion protein; outer membrane	<b>-1,37</b>	<b>5,21E-07</b>	<b>-0,78</b>	<b>1,37E-05</b>
SEN2740	invF	invasion protein	<b>-1,84</b>	<b>5,8432E-09</b>	<b>-1,25</b>	<b>0,000286031</b>
SEN2741	invH	invasion protein	<b>-3,11</b>	<b>4,89E-10</b>	<b>-1,61</b>	<b>7,88E-09</b>
SEN2743		putative ABC-type transport system	0,20	0,441851895	0,19	0,455336989
SEN2744		putative acetyltransferase	0,67	1,82E-03	1,02	<b>6,99E-05</b>
SEN2745	pphB	serine/threonine specific protein phosphatase 2	0,81	0,016077422	0,90	0,005195089
SEN2746A			-0,70	0,001995155	-0,18	0,364504577
SEN2746A			0,13	0,603425871	-0,69	0,095193385
SEN2747		putative cytoplasmic protein	0,41	0,02774976	-0,64	0,012119296
SEN2747			0,85	0,00958083	0,52	0,065484713

Continúa



SPI4



SEN4026	putative inner membrane or exported	-0,64	0,199083056	-0,79	0,148203922
SEN4027	putative methyl-accepting chemotaxis protein	-3,12	1,98479E-10	-0,84	0,006769811
SEN4028	putative ABC exporter outer membrane component homolog	-3,95	1,53E-10	-2,00	6,12E-06
SEN4029	membrane permease, predicted cation efflux pump	-1,48	0,001512906	-1,18	0,006865326
SEN4030	putative inner membrane protein	-1,97	1,09E-08	-1,04	3,64E-07
SEN4030	putative inner membrane protein	0,17	0,385485268	0,26	0,123813571
SEN4032	putative ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporter, contain an N-terminal	-1,27	6,1168E-05	-0,90	0,028939387

SPI5



SEN0951	pipA	Pathogenicity island encoded protein: SPI3	-0,16	0,392098597	0,03	0,889159288
SEN0952	pipB	Pathogenicity island encoded protein: SPI3	-2,39	1,34157E-08	-0,95	0,001507342
SEN0953		putative inner membrane protein	-0,80	0,064962504	-0,38	0,191315753
SEN0954	pipC	Pathogenicity island encoded protein: homologous to ipgE of Shigella	-1,28	0,010424031	-0,24	0,608574886
SEN0955	sopB	Salmonella outer protein: homologous to ipgD of Shigella	-1,88	1,77E-05	-1,20	4,99E-08
SEN0956	orfX	putative cytoplasmic protein	-0,22	0,349509433	-0,14	0,570027287
SEN0957		putative cytoplasmic protein	0,25	0,626417877	0,43	0,382885863
SEN0958	pipD	Pathogenicity island encoded protein: SPI3	0,35	0,052727807	0,13	0,494622805

(B)

SEN 0995-1013C



SEN1001	Peptidoglycan-binding LysM	-2,57	3,17533E-05	-1,84	0,000275194
SEN1002	Hcp-like protein	-0,61	0,025944394	-0,61	0,111166714
SEN1002	Hcp-like protein	-1,66	6,43236E-05	-1,29	0,004188445

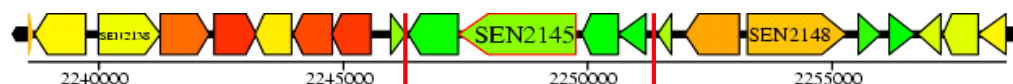
Continúa

SEN1970-1999



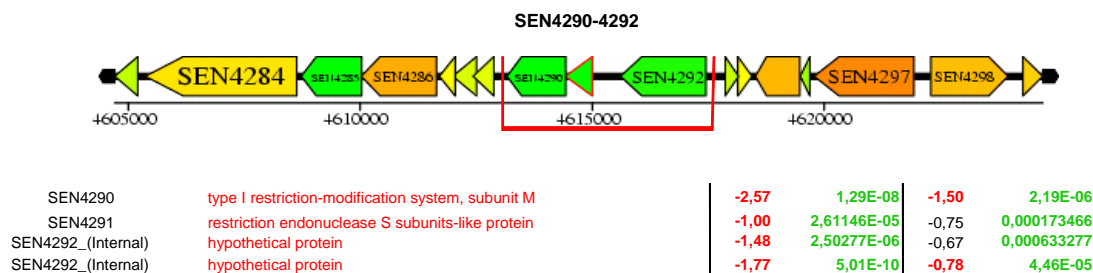
SEN1970	integrase	0,68	0,012917123	0,27	0,182836354
SEN1974	hypothetical protein	-0,07	0,871575849	0,34	0,373653246
SEN1975	hypothetical protein	<b>-2,20</b>	<b>2,49E-07</b>	<b>-1,66</b>	<b>4,11E-07</b>
SEN1977_(3'_half)	hypothetical protein	<b>-4,56</b>	<b>1,05E-12</b>	<b>-2,73</b>	<b>7,14E-07</b>
SEN1978	putative type IV pilin protein precursor	<b>-0,93</b>	0,039061383	-0,50	0,113925134
SEN1978	putative type IV pilin protein precursor	<b>-1,26</b>	0,004052006	-0,72	0,109761192
SEN1980	hypothetical protein	<b>-1,64</b>	<b>5,52751E-05</b>	<b>-0,82</b>	0,01513392
SEN1980	hypothetical protein	<b>-1,60</b>	<b>0,000144994</b>	-0,74	0,020832341
SEN1981	hypothetical protein	<b>-1,50</b>	<b>9,54598E-05</b>	<b>-1,11</b>	0,009204261
SEN1982	hypothetical protein	<b>-2,14</b>	<b>5,59884E-06</b>	<b>-0,89</b>	0,018837585
SEN1982	hypothetical protein	<b>-1,50</b>	<b>1,84231E-05</b>	-0,22	0,554629577
SEN1982	hypothetical protein	<b>-1,57</b>	<b>3,06818E-05</b>	<b>-0,86</b>	0,004687185
SEN1985	hypothetical protein	-0,68	0,167586241	-0,66	0,074372097
SEN1986	hypothetical protein	<b>-1,72</b>	<b>1,77165E-06</b>	-0,25	0,327150051
SEN1986	hypothetical protein	<b>-1,58</b>	<b>1,15483E-06</b>	-0,06	0,790406902
SEN1990	putative DNA-binding protein	-0,61	0,174855884	-0,31	0,45622518
SEN1991	hypothetical protein	-0,59	0,069841197	-0,61	0,057819818
SEN1993	putative DNA-binding protein	<b>-1,06</b>	<b>6,36509E-06</b>	-0,57	0,004744215
SEN1993	putative DNA-binding protein	<b>-0,92</b>	<b>6,54094E-05</b>	-0,27	0,169003623
SEN1994	hypothetical protein	<b>-2,49</b>	<b>1,1497E-08</b>	<b>-1,43</b>	0,004703162
SEN1995	enteric hypothetical protein	<b>-3,31</b>	<b>2,06424E-09</b>	0,28	0,639048498
SEN1999	hypothetical protein	<b>-0,81</b>	<b>0,000633523</b>	-0,30	0,246102709
SEN1999	hypothetical protein	-0,54	0,023002186	-0,03	0,87345191

SEN2144A-2145B



SEN2144A	hypothetical protein	<b>-1,91</b>	<b>1,08E-08</b>	<b>-1,34</b>	<b>3,56E-06</b>
SEN2144A	hypothetical protein	<b>-2,32</b>	<b>1,40E-09</b>	<b>-1,48</b>	<b>2,19E-06</b>
SEN2145	putative outer membrane usher protein	<b>-0,90</b>	<b>1,70371E-05</b>	-0,12	0,626888694
SEN2145_(5'_end)	putative outer membrane usher protein	-0,68	0,01737053	-0,05	0,75685079
SEN2145_(5'_end)	putative outer membrane usher protein	-0,72	<b>0,000483256</b>	-0,12	0,430292249
SEN2145A	putative fimbrial chaperone protein	<b>-4,48</b>	<b>1,29E-10</b>	<b>-3,75</b>	<b>3,90E-10</b>
SEN2145A	putative fimbrial chaperone protein	<b>-4,05</b>	<b>9,07E-13</b>	<b>-3,28</b>	<b>1,08E-10</b>
SEN2145A	putative fimbrial chaperone protein	<b>-3,00</b>	<b>2,45E-08</b>	<b>-2,43</b>	<b>2,90E-09</b>
SEN2145A	putative fimbrial chaperone protein	<b>-2,68</b>	<b>1,37E-06</b>	<b>-2,20</b>	<b>5,93E-07</b>
SEN2145B	putative fimbrial subunit protein	<b>-1,03</b>	0,006251827	<b>-0,95</b>	0,008070763
SEN2145B	putative fimbrial subunit protein	<b>-1,43</b>	<b>7,79E-05</b>	<b>-1,54</b>	<b>4,70E-07</b>
SEN2145B	putative fimbrial subunit protein	<b>-1,29</b>	<b>1,96E-05</b>	<b>-1,22</b>	<b>3,24E-07</b>

Continúa



**Figura 11. Análisis global de mutantes de *S. Enteritidis* pertenecientes a una genoteca de transposones que presentan deficiencias en la colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c por “microarreglos”.** Valores obtenidos de la razón de intensidad de fluorescencia producida por la muestra “input” versus “output” marcadas con fluoróforos Cy3 o Cy5 (M) y significancia estadística del valor obtenido (P) para genes correspondientes a regiones de las cinco islas genómicas generales del género *Salmonella* (A) y a regiones específicas de *S. Enteritidis* según los genomas representados en el “microarreglo” utilizado (B).

Como se muestra en la Figura 11A, se identificaron las cinco islas de patogenicidad comunes al género *Salmonella* (SPIs) previamente descritas como necesarias para la infección sistémica en ratones BALB/c. De especial interés para esta tesis, también se identificaron regiones que estaban solamente representadas por el serovar *Enteritidis* en el “microarreglo” utilizado en los experimentos y que se encontraban codificadas en islas genómicas (Figura 11B).

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las regiones seleccionadas con el genoma de otras especies relacionadas presentes en bases de datos (BLAST) nos permitió identificar funciones hipotéticas para algunos de los genes que codifican:

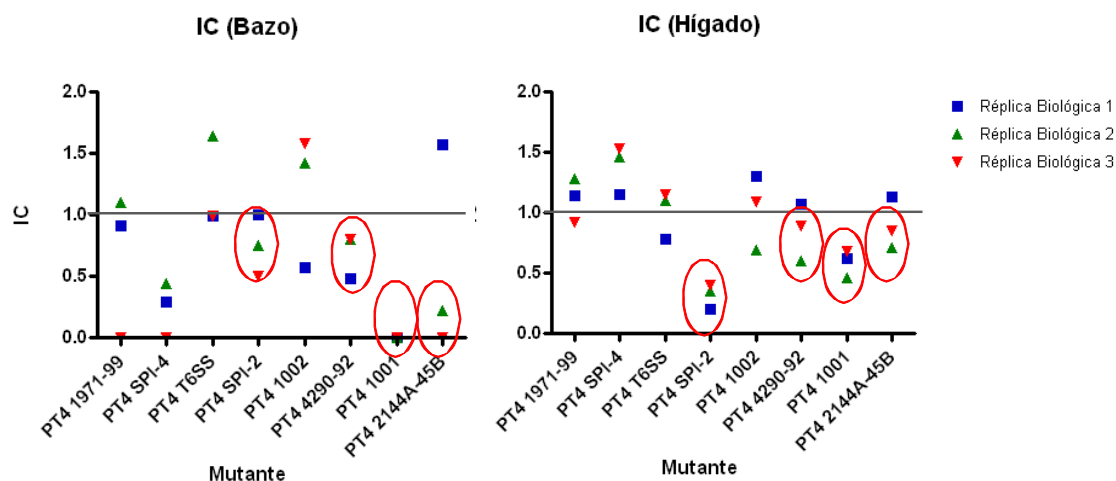
- SEN1001 y SEN1002: Genes pertenecientes a un sistema de secreción tipo VI
- SEN1971-1999: Región que contiene un pili tipo IV y una proteína con dominio TIR
- SEN2144A-2145B: Región que codifica genes fimbriales
- SEN4026-4032: Isla de Patogenicidad 4 (común del género *Salmonella*)
- SEN4290-4292: Genes que codifican un sistema de restricción-modificación tipo I

### **3.3 Mutantes en regiones específicas de *S. Enteritidis* presentan diversos niveles de atenuación de colonización de órganos internos (bazo e hígado) de ratones BALB/c.**

#### **3.3.1 Ensayos de competencia *in vivo***

Con el objeto de confirmar que los genes identificados por la metodología de selección negativa son necesarios para la colonización *in vivo* en ratones BALB/c, se generaron cepas mutantes que presentaban deleciones de cada una de las cinco islas genómicas mencionadas anteriormente (ver Figura 11B) mediante reemplazo alélico como se describió en Materiales y Métodos. Con cada mutante se realizaron ensayos de competencia *in vivo* para evaluar el grado de virulencia relativo en comparación al de la cepa silvestre, calculando un índice de competencia (IC) según la fórmula descrita en Materiales y Métodos. Así, un valor de  $IC \leq 1$  indica que la mutante analizada posee una capacidad de colonización menor que la cepa silvestre. Por el contrario, un valor de  $IC \geq 1$  indica que la mutante analizada posee una capacidad de colonización mayor que la cepa silvestre. Por último, un valor de IC igual o cercano a 1 significa que ambas bacterias tienen una capacidad de colonización similar.

Se inoculó por vía intraperitoneal (IP) en 3 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de vida una dilución en PBS de  $10^4$  ufc de una mezcla de cada mutante a analizar y la cepa silvestre en proporción 1:1. Posterior a la extracción de los órganos, 100  $\mu$ l del homogenizado se utilizaron para el recuento final de bacterias totales y bacterias mutantes respectivamente. Con los datos obtenidos se calculó el índice de competencia (IC) (Figura 12).



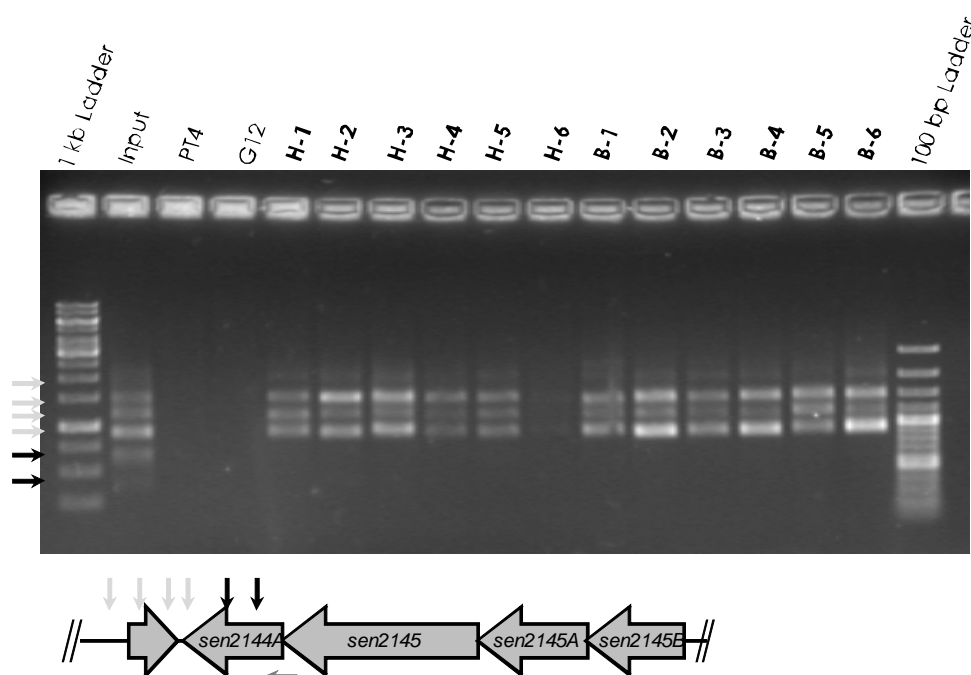
**Figura 12. Ensayo de competencia *in vivo* en ratones BALB/c.** El gráfico muestra los valores de IC obtenidos en el experimento de competencia para comparar la capacidad de colonización de órganos internos de ratones BALB/c entre mutantes específicas versus la cepa silvestre. Cada valor obtenido corresponde a una réplica biológica determinada por triplicado.

Según los resultados obtenidos, se puede observar una disminución en la colonización de bazo e hígado de ratones BALB/c en las mutantes de los marcos de lectura *SEN1001*, *SEN2144A-2145B*, *SEN4290-4292* y la Isla de Patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2). Las mutantes para el gen *SEN1002* y la Isla de Patogenicidad 4 de *Salmonella* (SPI-4) presentaron diferencias para ambos órganos y se observó una hipervirulencia por parte de la mutante de la región génica comprendida entre *SEN1971-1999*.

### 3.3.2 Identificación de inserciones en regiones cromosomales específicas mediante el empleo de “genetic footprinting”

Se escogió una de las regiones genómicas que presentó atenuación en los experimentos previos de “microarreglo” y en ensayos de competencia *in vivo*. Se amplificaron las inserciones del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> como se describió en Materiales y métodos. (Figura 13).





**Figura 13. Análisis de “genetic footprinting” en la región cromosomal cercana al gen *SEN2144A*.** Gel de agarosa al 1% que contiene los productos de amplificación correspondientes al número de inserciones del transposón por muestra. Carril 1: Ladder de 1 KB Gene Ruler; Carril 2: genoteca cultivada *in vitro* utilizada como “input” en los ensayos de colonización *in vivo*; Carril 3: control negativo de la reacción utilizando ADN genómico de la cepa silvestre como templado; Carril 4: control de selectividad utilizando una mutante obtenida de la genoteca al azar; Carriles 5-10: amplificación utilizando ADN genómico obtenido de hígados extraídos en el experimento de colonización de la genoteca *in vivo*; Carriles 11-16: amplificación utilizando ADN genómico obtenido de bazo extraídos en el experimento de colonización de la genoteca *in vivo*; Carril 17: Ladder 100 bp Gene Ruler.

Las bandas observadas en el “input” dan cuenta del número de inserciones totales en la región analizada, obtenidas por la mutagénesis al azar. En este caso, se logró detectar seis inserciones. Por los tamaños de los fragmentos obtenidos y utilizando herramientas bioinformáticas, se estableció que sólo dos de estas inserciones se encuentran en el gen *SEN2144A*. Como se observa en la figura, estos dos fragmentos (marcados en negro) no son amplificados en las muestras recuperadas desde los órganos internos en comparación con el “input”, por lo que corresponden a inserciones que provocaron que la bacteria se perdiera de la población sometida a la selección. Esta observación confirma los resultados obtenidos en los experimentos de “microarreglo” y de competencia *in vivo* que dan cuenta de la importancia de este gen para una colonización de bazo e hígado de ratones BALB/c.

#### 4. DISCUSIÓN

*S. Enteritidis* en la actualidad representa la primera causa de salmonelosis asociada a alimentos y es el serovar de *Salmonella* aislado con mayor frecuencia en Chile. *S. Enteritidis* tiene la capacidad de infectar una gran variedad de hospederos (Galán y cols., 1996), entre ellos aves de corral, roedores (ratones) y humanos, lo cual genera un gran problema de salud pública y un riesgo para la población animal.

*S. Enteritidis* es capaz de generar una infección sistémica en aves y ratones con colonización de órganos internos como bazo e hígado (Guard-Petter., 2001), mientras que en el hombre provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal (Hennessy y cols., 1996). Se piensa que existe una similitud entre los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por *S. Enteritidis* en aves y roedores y los utilizados por *S. Typhimurium* para causar una enfermedad sistémica en el ratón. Los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por *Salmonella enterica* involucran una gran cantidad de genes, generalmente agrupados en regiones denominadas islas genómicas, sin embargo, el papel que cumplen muchas de estas islas aún es desconocido.

El objetivo de este estudio fue buscar nuevos genes candidatos a participar en la fase aguda de la infección sistémica por *S. Enteritidis* y que se encontraran codificados en islas genómicas. Para esto, en el presente trabajo se ha desarrollado un método de análisis global, acelerando así la búsqueda de genes potencialmente involucrados en virulencia bacteriana (Burrack e Higgins, 2007). Nuestra estrategia consistió en analizar una genoteca de mutantes que contienen inserciones de transposones al azar en un ambiente selectivo. Las bacterias que hayan adquirido la inserción del transposón en

regiones particulares esenciales para su supervivencia en el medio, se perderán de la población debido a un proceso de selección negativa. Los transposones posteriormente pueden ser detectados por amplificación del ADN genómico adyacente para realizar una hibridación en un “microarreglo” que represente todos los genes del microorganismo a estudiar. Estas técnicas han sido previamente utilizadas para detectar o confirmar el rol de muchos genes involucrados en la virulencia de *Salmonella* Typhimurium (Lawley y cols., 2006; Chan y cols., 2005).

Esta metodología se usó en esta tesis para identificar aquellas mutantes de una genoteca que no son capaces de colonizar los órganos internos de ratones BALB/c. En este modelo de estudio estos órganos constituyen el ambiente para la selección negativa. Para esto, se inyectó una genoteca de mutantes de *S. Enteritidis* por vía intraperitoneal (IP) a ratones BALB/c y se recuperaron las bacterias desde el bazo e hígado dos días después de la infección. Las mutantes recuperadas desde los órganos fueron analizadas mediante “microarreglos”. En base a esto, identificamos genes y regiones genómicas necesarios para la colonización de bazo e hígado en nuestro modelo *in vivo*. Para validar nuestros resultados, se realizó un ensayo de competencia *in vivo* versus la cepa silvestre utilizando mutantes específicas en estos genes.

Los resultados obtenidos permitieron identificar una significativa y consistente reducción de las mutantes que contenían la inserción del transposón en regiones cercanas o dentro de casi todos los genes previamente asociados con virulencia en *Salmonella*, lo cual valida el método utilizado. En paralelo, se identificaron nuevas regiones genómicas que contribuyen a la colonización del bazo y del hígado de ratones BALB/c.

En base a nuestros resultados, se establecieron genes que presentaron diferencias significativas de colonización *in vivo* respecto al control. Es decir, se consideran como necesarios para la virulencia de la bacteria cuando es administrada por vía intraperitoneal. Ejemplos de estos genes son los involucrados en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos (*aroE*, *aroD*, *aroB*, *aroP*), genes involucrados en el metabolismo de purinas (*purF*, *purD*, *purB*, *purR*, *purA*), genes que participan en la regulación de respuesta a estímulos externos (reguladores globales) (*phoP*, *phoQ*, *arca*, *arcB*, *envZ*, *fimZ*, *rpoN*, *crp*, *fur*), genes involucrados en el transporte de hierro (*feoB*, *sitD*), genes regulados por el regulón *phoP/Q* (*pagO*, *pqaA*, *pagD*), genes de los regulones y efectores de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 y genes involucrados en la biosíntesis del LPS (*rfaB*, *rfaG*, *rfaI*, *rfaL*, *rfaF*, *rfaH*, *rfaJ*, *rfaK*, *rfaC*). La participación de estos genes en la virulencia de *Salmonella* se ha descrito ampliamente (Lawley y cols., 2006; Chan y cols., 2005) por lo que su detección valida la metodología empleada y el modelo animal escogido. Es importante destacar que la SPI-1, entre otros genes identificados como necesarios para la gastroenteritis (SPI-5 y efectores relacionados a ambas islas), juega un rol principal en la invasión del tejido epitelial intestinal. Resulta inesperado encontrar que esta isla cumpla un papel de relevancia en virulencia al realizar una inoculación intraperitoneal debido a que no se está evaluando la etapa de invasión como una barrera para la infección. La selección negativa de las mutantes en genes de la SPI-1 podría explicarse si éstas alcanzan el lumen intestinal, en donde no serían capaces de invadir el tejido epitelial. De esta forma, no podrían acceder al torrente sanguíneo para contribuir a la población que coloniza hígado y bazo a las 48 horas.

Como era esperado según la hipótesis, nuestros datos indican que existen genes codificados en islas genómicas del serovar Enteritidis necesarios para la virulencia de la bacteria. Dentro de este grupo, existen genes que no han sido relacionados con patogenicidad, como aquéllos que codifican: (i) un sistema de restricción modificación tipo I, el cual protege a las bacterias de ADN foráneo, (ii) los

componentes de una fimbria no descrita en la literatura, (iii) islas genómicas que por análisis bioinformático podrían codificar factores de virulencia hipotéticos. Por otra parte, se encontraron genes individuales y otros codificados en islas de patogenicidad conservados entre los distintos serovares de *Salmonella* representados en el “microarreglo” utilizado. Dentro de este último grupo cabe destacar los genes pertenecientes a la SPI-4, que codifica un sistema de secreción tipo I y su proteína efectora. Nuestros resultados demuestran un papel importante para estos genes en el modelo de colonización de órganos internos de ratón por vía IP, el cual no se ha descrito para otros serovares del género *Salmonella*.

Se construyeron seis mutantes que presentan deleciones de genes o regiones específicas que sólo se encuentran en el serovar Enteritidis respecto a los serovares representados en el “microarreglo” utilizado y se sometieron a ensayos de competencia *in vivo* versus la cepa silvestre para confirmar el fenotipo observado.

Las primeras mutantes a ensayar correspondieron a bacterias que presentan deleciones de genes individuales (*SEN1001* y *SEN1002*). Por análisis de secuencia y comparación con otras especies bacterianas relacionadas, ambos genes podrían codificar proteínas pertenecientes a un sistema de secreción tipo VI, el cual aún no ha sido caracterizado en *Salmonella*. Los sistemas de secreción de proteínas han sido ampliamente descritos en las bacterias Gram-negativo. Los sistemas tipo I, III y IV transportan proteínas en un solo paso desde el citoplasma bacteriano a la superficie de la bacteria y medio externo. En el caso de los sistemas tipo III y IV las proteínas son transportadas desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de la célula blanco. Los sistemas de secreción II y V transportan proteínas en dos pasos (Filloux y cols., 2008).

El sistema de secreción tipo VI ha sido descrito en *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En estas especies se ha detectado que estos sistemas median la secreción de proteínas denominadas Hcp y VgrG. En el caso de *Salmonella enterica* no se ha descrito este tipo de sistema de secreción, sin embargo, se identificó una agrupación de genes denominado SCI (Isla genómica del centisoma 7 de *Salmonella enterica*) (Folkesson y cols., 2002) que contiene 37 genes, algunos de los cuales podrían codificar componentes estructurales para el sistema de secreción tipo VI, incluyendo una proteína que por homología de secuencia aminoacídica es similar a Hcp (*SEN1002*). Según nuestros resultados, no se encontró una disminución de la colonización *in vivo* en mutantes definidas que carecen de este marco de lectura.

Por otra parte, el marco de lectura *SEN1001* codifica una proteína que contendría un dominio LysM, el cual se encuentra presente en “lisinas” bacterianas y es similar al de una hidrolasa de peptidoglicán. Este dominio también se ha encontrado en diversas proteínas consideradas como factores de virulencia para el ser humano. Un ejemplo de esto es una proteína de *E. coli* enterohemorrágica y enteropatogénica que participa en la adherencia de las bacterias a las células del hospedero (Buist y cols., 2008). Nuestros resultados revelaron una fuerte atenuación de las mutantes definidas que carecían de la expresión de esta proteína, lo que podría ser de gran utilidad para encontrar nuevos mecanismos de patogenicidad en *S. Enteritidis*. La función de esta proteína podría estar relacionada con la degradación del peptidoglicán, proceso necesario para la posterior síntesis y ensamblaje de la pared celular, participando así en la mantención de la integridad bacteriana.

Se evaluó una tercera mutante que presenta una delección de una isla genómica completa que abarca desde el gen *SEN1971* al *SEN1999*. Esta isla se encuentra adyacente a un gen que codifica un ARN de transferencia para asparragina (*asnT*), entre sus marcos de lectura existe un gen que codifica

una integrasa y posee directos repetidos en sus extremos, características clásicas de islas genómicas adquiridas mediante transferencia horizontal. Por análisis de secuencia aminoacídica con proteínas de otras especies relacionadas se encontró que *SEN1975* codifica una proteína que contiene un dominio TIR.

A lo largo de la evolución, los microorganismos patógenos han desarrollado estrategias moleculares para evadir o modular la respuesta inmune de su hospedero. Dentro de ellas se encuentra la secreción de proteínas que contienen un dominio TIR, las cuales interfieren directamente en la transducción de señales a nivel de las proteínas adaptadoras de los receptores tipo Toll presentes en las células responsables de la respuesta inmune innata (Cirl y cols., 2008).

En el año 2006, Newman y colaboradores denominaron al marco de lectura *SEN1975* como TlpA en *S. Enteritidis* y demostraron que esta proteína suprime la inducción del factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la cascada de señales de receptores tipo Toll, además de ser necesaria para una virulencia completa en ensayos *in vitro*. TlpA también cumple otras funciones, como promover la activación de caspasa-1 lo cual culmina en secreción de IL-1 $\beta$  y en la inducción de apoptosis de macrófagos. Esto promovería la llegada de más células del sistema inmune al sitio de infección para ser usadas como vehículo para la diseminación sistémica de *Salmonella*.

Esta isla genómica también contiene marcos de lectura que codifican para proteínas precursoras y estructurales de pili tipo IV (*SEN1976-SEN1978*), los cuales participan en motilidad, adherencia, formación de biofilms y agregación bacteriana, contribuyendo así a la invasión de la célula hospedera (Hansen y Forest, 2006). En nuestros resultados de “microarreglo” se observó un fenotipo de atenuación en mutantes con inserciones en genes individuales codificados en esta isla. Sin embargo,

en ensayos de competencia *in vivo* se observó una inesperada hipervirulencia por parte de la mutante que carecía de la isla completa. Esto podría deberse a que la pérdida de la isla genómica completa produce un fenotipo distinto al de la pérdida de funciones codificadas por genes individuales. Alternativamente, la pérdida de la isla provocaría la pérdida de una función moduladora del sistema inmune del hospedero, no pudiendo controlar la diseminación del patógeno y la posterior colonización de sus órganos internos.

La cuarta mutante en estudio correspondió a una bacteria que carecía de la isla genómica comprendida entre *SEN2144A* y *SEN2145B*. Por análisis de secuencia nucleotídica, esta región codificaría para genes fimbriales. Las bacterias entéricas poseen múltiples fimbrias, muchas de las cuales juegan un papel crítico en la adherencia a la superficie de las células epiteliales. En el año 2000, Edwards y colaboradores describieron una fimbria denominada SEF14, la cual se encuentra solamente en el serovar Enteritidis y demostraron que ésta es requerida para la virulencia en la etapa de infección posterior a la barrera intestinal. También demostraron que SEF14 es requerida para evitar la captación de la bacteria por parte de los macrófagos luego de una infección intraperitoneal siendo esencial para la sobrevivencia de *S. Enteritidis* en ratones (Edwards y cols., 2000). Mediante análisis bioinformáticos determinamos que nuestra isla genómica no corresponde a SEF14. Sin embargo, es probable que la fimbria codificada en nuestra isla cumpla una función similar a SEF14 que debería ser mayormente estudiada, ya que nuestros ensayos de competencia revelaron una atenuación importante de la mutante  $\Delta$ *SEN2144A-SEN2145B*.

La quinta mutante estudiada carecía de una isla genómica completa que abarca desde el gen *SEN4026* al gen *SEN4032*, esta isla corresponde a la SPI-4, isla de patogenicidad común para el género *Salmonella*. Previamente, se había establecido en *S. Typhimurium* que esta isla es requerida para la



infección oral y no así intraperitoneal. En el caso de *S. Enteritidis*, la isla completa es necesaria para la virulencia cuando la bacteria es administrada por vía oral (Kiss y cols., 2007). Inesperadamente, nuestros resultados revelan la importancia de esta isla para la colonización exitosa de los órganos internos de ratones BALB/c en un modelo de infección intraperitoneal, siendo estos resultados novedosos que no se han descrito previamente.

La última mutante analizada en nuestro estudio correspondió a una bacteria que presenta una delección de la región comprendida entre los marcos de lectura *SEN4290* y *SEN4292* que por análisis de secuencia aminoacídica codificarían un sistema de restricción y modificación de tipo I. Los sistemas de restricción y modificación bacterianos son los encargados de proteger al microorganismo del ADN foráneo. Generalmente, codifican una endonucleasa que corta el ADN en sitios de reconocimiento específicos y una metiltransferasa que adiciona un grupo metilo al sitio de restricción previniendo el corte por su endonucleasa. Se clasifican como tipo I, II o III según el número de subunidades y organización, cofactores utilizados, mecanismo enzimático y especificidad de secuencia. El sistema de restricción y modificación de tipo I es el más complejo, ya que está conformado por sólo una proteína compuesta por tres subunidades responsables de la unión, metilación y restricción del ADN (Bullas y cols., 1980; Pouillot y cols., 2007).

El único antecedente que existe en la literatura en el cual se vincula un sistema de restricción y modificación de tipo I con virulencia es un estudio en *Yersinia pseudotuberculosis* en el cual se establece que la mutante que carece de este sistema tiene deficiencias en el crecimiento en un medio de cultivo definido que quizás podría imitar las condiciones que encuentra la bacteria en el hospedero (Pouillot y cols., 2007). Nuestros resultados revelan atenuación por parte de esta mutante y en el caso de *Salmonella* no se ha establecido ningún tipo de relación entre este sistema y la virulencia del

patógeno, siendo nuestros resultados de gran relevancia, ya que pueden contribuir al entendimiento del mecanismo molecular de la infección y establecer nuevos factores implicados en su virulencia. Sin embargo, es importante mencionar que se ha descrito que el sistema Dam (restricción y modificación de tipo II) juega un papel relevante en la patogenicidad de *S. Typhimurium*, a través de la regulación epigenética de genes de virulencia (Heusipp y cols., 2007).

La estrategia utilizada en esta tesis nos permitió identificar genes involucrados en la virulencia de *S. Enteritidis* no descritos previamente. Por otra parte, esta aproximación experimental es de utilidad para identificar genes necesarios en las distintas etapas de la infección (gastroenteritis, infección sistémica y persistencia). También permite establecer diferencias en la colonización en distintos hospederos (aves, ratones, tortugas) y podría ser utilizada incluso para identificar genes necesarios para la supervivencia de *Salmonella* aún cuando se encuentra fuera del hospedero. Esto último tiene relevancia directa con la eficacia de transmisión del patógeno al hospedero y seguridad alimentaria, pudiendo establecer así el rol de genes de los cuales se conoce vagamente su función o definitivamente es desconocida.

## 5. CONCLUSIONES

- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis es capaz de colonizar bazo e hígado de ratones BALB/c. Por lo cual el modelo de colonización de órganos internos de ratón nos permite evaluar directamente la virulencia *in vivo* en este patógeno.
- La mutagénesis por inserción al azar del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Epicentre) tiene una alta eficiencia y permite obtener una genoteca de mutantes que representa el genoma de *S. Enteritidis*.
- Una genoteca de mutantes generada por inserción al azar del transposón EZ-Tn5™ <T7/KAN-2> (Epicentre) puede ser utilizada para el análisis de selección negativa en ensayos de colonización *in vivo* mediante hibridaciones en “microarreglos” genómicos de ADN, permitiendo la identificación global de genes necesarios para la virulencia de *S. Enteritidis*.
- Dentro de los genes identificados como necesarios para la virulencia de *S. Enteritidis* se encontró una gran cantidad de genes conservados con *S. Typhimurium* cuya participación en virulencia está ampliamente descrita en la literatura, validando la metodología y el modelo animal utilizado en nuestro análisis.

- Genes codificados en islas genómicas pertenecientes a *S. Enteritidis* son necesarios para la colonización de órganos internos de ratones BALB/c. Entre estos se encuentran: (i) genes que codifican una proteína que contendría un dominio LysM presente en “bacteriolisinas” y similar al de una hidrolasa de peptidoglicán; (ii) genes que codifican proteínas fimbriales; (iii) una isla de patogenicidad común para el género *Salmonella* (SPI-4) y (iv) genes que codifican un sistema de restricción y modificación de tipo I. Ninguna de éstas islas genómicas ha sido relacionada previamente con la virulencia de *S. Enteritidis* cuando es administrada por vía intraperitoneal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. (2003).** Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* 185(12):3624-3635.
- 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 , A J, Tsois 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* 107:81-89.
- Bohez L, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. (2007).** Long-term colonisation-inhibition studies to protect broilers against colonisation with *Salmonella* Enteritidis, using *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and 2 mutants. *Vaccine* 25(21):4235-4243.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R y Swaminathan B. (2000).** *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38(7):2465-2467.
- Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. (2008).** LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 68(4):838-847. Review.
- Bullas LR, Colson C, Neufeld B. (1980).** Deoxyribonucleic acid restriction and modification systems in *Salmonella*: chromosomally located systems of different serotypes. *J Bacteriol* 141(1):275-292.
- Burrack LS, Higgins DE. (2007).** Genomic approaches to understanding bacterial virulence. *Curr Opin Microbiol* 10(1):4-9. Review.
- Cerqueti MC, Gherardi MM. (2000).** Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol* 76:185-192.
- Chan K, Kim CC, Falkow S. (2005).** Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 73:5438-5449.
- 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.
- Datsenko KA y Wanner BL. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6640-6645.
- Edwards RA, Schifferli DM, Maloy SR. (2000).** A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(3):1258-1262.

- 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* v.18 n.2.
- Figuroa Ochoa I, Verdugo A. (2005).** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol* 47 (1-2): 25-42.
- Filloux A, Hachani A, Bleves S. (2008).** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154(6):1570-1583. Review.
- Folkesson, A., Lofdahl, S. & Normark, S. (2002).** The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* 153:537-545.
- Galán JE. (1996).** Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 209:43-60.
- Guard-Petter, J. (2001).** The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* 3(7):421-430.
- Guiney DG. (2005).** The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:131-150. Review.
- Hansen JK, Forest KT. (2006).** Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11(3-5):192-207. Review.
- Hennessy TW, Hedberg CW, Slutsker L, White KE, Besser-Wiek JM, Moen ME, Feldman J, Coleman WW, Edmonson LM, MacDonald KL, Osterholm MT. (1996).** A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. The Investigation Team. *N Engl J Med* 334(20):1281-1286.
- Heusipp G, Fälker S, Schmidt MA. (2007).** DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int J Med Microbiol.* 297(1):1-7
- Hueffer K, Galán JE. (2004).** *Salmonella*-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes. *Cell Microbiol* 6(11):1019-1025. Review
- Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. (1995).** Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269(5222):400-403.
- Hensel M. (2004).** Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294(2-3):95-102.
- Kiss T, Morgan E, Nagy G. (2007).** Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 275(1):153-159.
- Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM. (2006).** Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2(2):e11.
- Methner U, Barrow PA, Gregorova D, Rychlik I. (2004).** Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella phoP*, *rpoS* and *ompC* deletion mutants in chickens. *Vet Microbiol* 98(1):37-43.

- 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.
- Ochman H, Groisman EA. (1996).** Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 64(12):5410-5412.
- Parker CT, Liebana E, Henzler DJ, Guard-Petter J. (2001).** Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ Microbiol* 3(5):332-342.
- 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):6545-6555.
- Pouillot F, Fayolle C, Carniel E. (2007).** A putative DNA adenine methyltransferase is involved in *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity. *Microbiology* 153(8):2426-2434.
- Raetz, C.R., Whitfiel C. (2002).** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.
- Santos RL, Bäumler AJ. (2004).** Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294:225-233
- Ward LR, de Sa JD, Rowe B. (1987).** A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* 99(2):291-294.
- Xia X, McClelland M, Wang Y. (2005).** WebArray: an online platform for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 6(1):306.