

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



**“Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre las modificaciones covalentes del lipopolisacárido de *Salmonella* Enteritidis: participación de los reguladores globales ArcA y Fnr”**

**Memoria para optar al Título de Bioquímico**

**FELIPE IGNACIO VELÁSQUEZ SALINAS**

**Directores de Memoria**

Patrocinador: Dr. Sergio A. Álvarez  
Dr. Carlos A. Santiviago

**SANTIAGO - CHILE  
2016**

Esta Memoria se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. El estudio contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1130225 y 1140754.

*“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos”*

Eduardo Galeano

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Sergio Álvarez por darme la oportunidad de hacer este trabajo en el laboratorio de microbiología. Gracias por aguantar todas mis tonteras, mis ideas locas e incluso mi demora. Te quiero mucho estimado jefe.

A mi segundo jefe, el Dr. Carlos Santiviago. Muchas gracias porque también tuviste que aguantar todas mis ridiculeces. Gracias por la paciencia y el cariño.

A Don Luis “Lindo precioso”, porque sin el laboratorio no sería lo mismo. También muchas gracias a la Sra. Ximena, especialmente por todas las veces que me tuvo que abrir la puerta.

Al Dr. Andrés Barriga por su ayuda, consejos y orientación con la espectrometría de masas, A la Dra. Catalina Muños por prestarme el qRT-PCR y su amistad. A la Dra. Daniela Seelenfreund, al Dr. Sergio lobos y los integrantes del laboratorio de biología molecular, especialmente a la Claudita por prestarme siempre el Speed Vac, incluso después de aquella vez.

A Davisito y a papi Blondi, por los bueno momentos y lo que aprendí de ustedes. Primo gracias por las rizas y el cariño más allá del lab. Tio RAET, gracias por tu particular visión de la vida. Agradezco especialmente a la Sita Chechi y papi Moli, por todo lo que aprendí de ustedes y sigo aprendiendo, gracias por los consejos y su amistad, los extraño mucho.

Gracias Kamo por toda la ayuda que me diste y me sigues dando. Sita Andrea el lab no habría sido lo mismo sin ti y tus comentarios destructivos. Nico “Maestro” junto Paulita gracias y porque ustedes nos enseñaban las diferencias entre el árabe palestino y egipcio. Sebita, gracias por tu amistad durante nuestras tesis, y ahora en nuestra nueva etapa como compañeritos. Gracias Bayron por las charlas y tu amistad; Fernando por ser el mejor automata que conozco; Hector, se que eres malo de cartón e Ítalo gracias por siempre estar para ayudar y molestar al Bayron.

A mis amigos rulos Pablo y Verito, el Matu, Nico, Xoco, Nacho, y Cami por los carretes y su cariño, siempre se les extraña.

Alejo, Andrew, Maira y todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica, especialmente a Dr. Mauricio Baez por su ayuda en momentos difíciles.

Noe, miguel y violeta, gracias por su cariño y amistad.

A mis tatas Mirto y Oscar, aunque no están, siempre los llevo conmigo. Toncho y Nona, muchas gracias por estar aun aquí y regalarnos cada vez que vamos

A mis tíos Lulo, Claudia, Paci, Alex, Andy y Lala junto a mis primos. A mi tía Moni y Hugo junto a mis primos. A todos gracias.

A Cracra por las risas y la cerveza joven, aun te esperamos. Pía y Pancho por su buena onda, cariño y las historias de pancho.

A mis amigos Paulina, por siempre estar para reír o llorar y ser mi conciencia. Nobita, por estar cada vez que te he necesitado, aunque sea para servirme un vaso. Java porque no importa cuán lejos sea o lo tarde que llegues, se que siempre llegarás. Johany, porque sin ti no existiría la “cheverisidad”; por todas las salidas; conversación y las muchas cosas que nos quedan por hacer. A todos ustedes gracias por nunca dejarme solo.

A la familia de la pingüino, Don Calvo, tía Ruby, Pan con el Santi, Javi y especialmente al benja. Por aceptarme y hacerme parte de su familia, aunque les revise el refri y la ollas.

Finalmente, no sé como agradecer a mi Mama, porque has estado siempre conmigo, siempre has creído, en mí aunque no siempre lo he merecido. Las gracias no son suficientes para ti viejita. Te admiro viejita y te amo.

A mi hermana mayor, Teo, con su familia: las enanas y el pollo. Gracias por que somos hermanos, por poder ser tío y porque siempre me siento como en mi casa con ustedes. Te amo hermana.

A la Cami, por acompañarme toda la vida, por no ser solo mi hermanita, sino que mi amiga, mi consejera, incluso a veces un ejemplo. Porque podemos hablar de todo, discutir por todo, pelearnos, pero sé que nunca nos vamos a fallar. Te amo pollo amarillo.

A mi papá, porque a pesar de todo te amo mucho y por enseñarme las cosas que no debo hacer. Te amo.

Por último, te quiero agradecer pingüino, por quererme todo este tiempo a pesar de todo y esperarme. Porque me encanta lo trabajadora, responsable y dedicada que eres. Solo de mirarte, me hacer querer ser mejor. Gracias también por quererme como soy, aun con mi ridiculeces. Soy muy feliz contigo y te amo inmensamente.

## Índice General

<b>Índice General</b> .....	<b>v</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>x</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xii</b>
<b>Summary</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Materiales y Métodos</b> .....	<b>10</b>
2.1 Reactivos .....	10
2.2 Cepas Bacterianas.....	11
2.3 Plasmidios .....	12
2.4 Partidores .....	12
2.5 Condiciones y medios de cultivo.....	13
2.6 Extracción de LPS y lípido A.....	14
2.6.1 Extracción de LPS .....	14
2.6.2 Extracción de lípido A .....	14
2.7 Análisis de muestras de LPS y lípido A mediante electroforesis .....	16
2.8 Análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	17
2.9 Obtención de mutantes mediante el método de <i>Red Swap</i> .....	18
2.9.1 Extracción de DNA plasmidial.....	18
2.9.2 Preparación de bacterias electrocompetentes.....	18
2.9.3 Obtención de productos de PCR para la mutagenesis .....	19
2.9.4 Mutagénesis .....	20
2.9.5 Eliminación del casete de resistencia .....	21
2.10 Electroforesis en geles de agarosa.....	22
2.11 Extracción de mRNA.....	22
2.12 Síntesis de cDNA a partir de RNA total .....	23
2.13 Reacciones de qPCR.....	24
<b>3 Resultados</b> .....	<b>25</b>
3.1 Objetivo Específico 1.- Caracterizar las distintas modificaciones que presenta el lípido A de <i>Salmonella</i> Enteritidis en respuesta a la presencia y ausencia de oxígeno .....	25

3.1.1	Implementación de un protocolo para la purificación de lípido A.....	25
3.1.2	Análisis del lípido A mediante espectrometría de masas.....	29
3.1.3	Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la estructura del lípido A de S. Enteritidis .....	34
3.2	Objetivo Específico 2.- Determinar la participación de ArcA y/o Fnr en la generación de modificaciones del lípido A en respuesta a la disponibilidad de oxígeno .....	38
3.2.1	Participación de Fnr en las modificaciones del lípido A dependientes de la disponibilidad de oxígeno .....	39
3.2.2	Participación de ArcA en las modificaciones del lípido A dependientes de la disponibilidad de oxígeno .....	44
3.3	Objetivo Específico 3.- Determinar el rol de ArcA y Fnr en la regulación de la expresión génica de las enzimas responsables de las modificaciones del Lípido A 47	
<b>4</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>58</b>

## Índice de Figuras

Figura 1: Estructura del lipopolisacárido (LPS) de <i>S. Enteritidis</i> . .....	4
Figura 2: Estructura del lípido A. ....	6
Figura 3: Esquema de la purificación de LPS y obtención de lípido A. ....	15
Figura 4: Perfiles electroforéticos de LPS y LPS hidrolizado .....	26
Figura 5: Perfiles electroforéticos de lípido A obtenido mediante distintos tratamientos.....	28
Figura 6: Espectros de masa del lípido A de <i>S. Typhimurium</i> y <i>S. Enteritidis</i> .....	30
Figura 7: Perfiles electroforéticos de lípido A de <i>S. Enteritidis</i> y sus derivadas isogénicas $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ .....	32
Figura 8: Espectros de masa del lípido A de <i>S. Enteritidis</i> y sus derivadas isogénicos $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ .....	33
Figura 9: Efectos de la disponibilidad de oxígeno sobre la abundancia de especies de lípido A de <i>S. Enteritidis</i> .....	35
Figura 10: Efectos de la disponibilidad de oxígeno sobre la abundancia de especies de lípido A de <i>S. Typhimurium</i> .....	37
Figura 11: Efecto de la delección de <i>fnr</i> sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en <i>S. Enteritidis</i> cultivada en presencia de oxígeno .....	40
Figura 12: Efecto de la delección de <i>fnr</i> sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en <i>S. Enteritidis</i> cultivada en ausencia de oxígeno.....	41

Figura 13: Espectrometría de masas del lípido A de la cepa $\Delta fnr$ complementada	43
Figura 14: Efecto de la delección de <i>arcA</i> sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en <i>S. Enteritidis</i> cultivada en presencia de oxígeno	45
Figura 15: Efecto de la sobreexpresión de <i>arcA</i> sobre y abundancia de especies de lípido A en <i>S. Enteritidis</i> cultivada en presencia de oxígeno	47
Figura 16: Efecto de la sobreexpresión de <i>arcA</i> sobre la abundancia de especies de lípido A en <i>S. Enteritidis</i> cultivada en ausencia de oxígeno	48
Figura 17: Efecto del oxígeno y de los reguladores transcripcionales Fnr y ArcA sobre la expresión relativa de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i>	51

## Índice de Tablas

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	11
Tabla 2: Plasmidios utilizados en este trabajo.....	12
Tabla 3: Partidores utilizados en este trabajo.....	12

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
AgO	Antígeno O
AgO-L	Antígeno O de moda larga
AgO-VL	Antígeno O de moda muy larga
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
Cam	Cloranfenicol
CH <sub>3</sub> COONa	Acetato de sodio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHB-AC	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico en ácido cítrico
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
EDTA	Ácido Etilendiamino tetraacético
g	Gramos
GIAcNac	D-glucosamina
h	Horas
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
L	Litro
LA-C	Lípido A - CORE
LA-CI	Lípido A – CORE interno
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido

M	Concentración molar
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser matriz asistida Tiempo de Vuelo
min	Minutos
N	Concentración normal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
TAE	Tris-acetato EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
u	Unidades enzimáticas
V	Volumen
xg	Aceleración de gravedad
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro

## Resumen

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Ambas especies agrupan a más de 2500 serovares. Los serovares de *S. enterica* más estudiados por el impacto que provocan en la salud pública son *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, siendo este último el principal agente etiológico de salmonelosis a nivel mundial.

Durante su ciclo infectivo, *Salmonella* se ve enfrentada a variaciones de distintas condiciones ambientales frente a las cuales debe adaptarse, como por ejemplo cambios en el pH, en la osmolaridad y en la disponibilidad de oxígeno. Además, estas condiciones ambientales sirven de señal para modular la expresión de factores de virulencia. Uno de estos factores es el lipopolisacárido (LPS), componente principal de la envoltura de las bacterias Gram negativo.

El LPS está compuesto por tres dominios estructurales: el antígeno O (AgO), la región del CORE y el lípido A, también llamado endotoxina. Este último ancla el LPS a la membrana externa y es un conocido factor de virulencia, responsable de la inducción de la respuesta del sistema inmune. El lípido A es capaz de sufrir modificaciones covalentes, las que modulan su toxicidad y ayudan a la bacteria a evadir distintos agentes antimicrobianos y el sistema inmune del hospedero.

Una de las principales variables a las que se ve enfrentada *Salmonella* durante su ciclo infectivo es la disponibilidad de oxígeno. Durante la transición aerobiosis-anaerobiosis participan los reguladores globales de respuesta a la anaerobiosis ArcA y Fnr. Previamente demostramos que estos factores están involucrados en el control del grado de polimerización del AgO en respuesta a la disponibilidad de oxígeno. Esto llevó a preguntarnos si los reguladores globales ArcA y Fnr estarían involucrados en el control de eventuales modificaciones covalentes en el lípido A generadas en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre las modificaciones covalentes del lípido A en *S. Enteritidis* y la

participación de los factores transcripcionales ArcA y Fnr en este proceso. Para esto, primero se montó un método de extracción de LPS y su tratamiento hidrolítico para la obtención de lípido A altamente purificado para estudiar la diversidad de especies de esta molécula mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. De esta forma, en presencia de oxígeno se observaron cuatro señales principales, correspondientes a lípido A hexaacilado y heptaacilado, con sus correspondientes especies hidroxiladas. Bajo esta condición estas últimas especies fueron las más abundantes. Por otra parte, en el cultivo anaeróbico también detectamos las mismas señales, pero la relación se invirtió, siendo más abundantes las especies no hidroxiladas. Para determinar la participación de ArcA y Fnr en la regulación de modificaciones covalentes del lípido A, se generaron las cepas  $\Delta arcA$  y  $\Delta fnr$  y una cepa que sobreproduce el regulador ArcA (*parcA*). Se determinó que ambos reguladores participan en el control de los cambios estructurales del lípido A ocurridos en respuesta a la disponibilidad de oxígeno. Adicionalmente, se observó que estos reguladores controlan otras modificaciones covalentes del lípido A.

La enzima LpxO (codificada en el gen *lpxO*) es responsable de las hidroxilaciones del lípido A en *Salmonella*. Se estudió la expresión relativa de este gen (anaerobiosis/aerobiosis) en *S. Enteritidis* silvestre y sus derivadas isogénicas  $\Delta fnr$  y *parcA* mediante qRT-PCR. Nuestros resultados indican que la expresión de *lpxO* depende de la disponibilidad de oxígeno, lo que concuerda con los cambios del nivel de hidroxilación ya descritos. Además, ArcA y Fnr participan en la modulación de la expresión de este gen.

Los resultados de este estudio evidencian el cambio en el grado de hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis* en respuesta a la disponibilidad de oxígeno, en la que participan los reguladores globales de respuesta a la anaerobiosis ArcA y Fnr. Estos hallazgos aportan al entendimiento de los mecanismos moleculares de adaptación al ambiente utilizados por *Salmonella* durante su ciclo infeccioso.

## Summary

### **“Effects of oxygen availability on covalent modifications of *S. Enteritidis* lipopolysaccharide: Role of global regulators ArcA and Fnr”**

The genus *Salmonella* belongs to the *Enterobacteriaceae* family and comprises two species: *S. bongori* and *S. enterica*. Both species include more than 2500 serovars. Within *S. enterica* serovars, the most studied are *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, the latter being the main causative agent of salmonellosis worldwide.

During its infective cycle, *Salmonella* needs to adapt to variations in different environmental conditions, such as changes in pH, osmolarity and oxygen availability. In addition, these conditions serve as environmental signals that modulate the expression of virulence factors. One of these factors is the lipopolysaccharide (LPS), the main component of the envelope of Gram negative bacteria.

The LPS presents three structural domains: the O antigen (AgO), the core region and lipid A, also called endotoxin. The latter anchors the LPS to the outer membrane, and is a known virulence factor responsible for the induction of the immune response. The lipid A domain is capable of undergoing covalent modifications, which modulate its toxicity and helps bacteria to evade antimicrobial agents and the immune system of the host.

One of the main environmental cues faced by *Salmonella* during its infectious cycle is the oxygen availability. During the aerobic-anaerobic transition participates the global regulators ArcA and Fnr. Results from our laboratory show that changes in the polymerization degree of the AgO in response to oxygen availability is modulated by these regulators. This observation led us to examine whether global regulators Fnr and ArcA are involved in the control of probable oxygen-dependent modifications of lipid A in response to oxygen availability.

The main goal of this study was to determine the effect of oxygen availability on covalent modifications of lipid A in *S. Enteritidis* and the participation of transcriptional factors ArcA and Fnr in this process. First, we mounted a method for LPS extraction followed by a hydrolysis step to obtain a highly-purified lipid A that can be used to study the composition of this molecule by MALDI-TOF. Thus, in aerobiosis we observed four major signals corresponding to hexa-acylated and hepta-acylated lipid A molecules and their corresponding hydroxylated species. Under this environmental condition, hydroxylated species were more abundant than non-hydroxylated species. In the case of anaerobic cultures we detected the same four signal, but this relationship is reversed, being more abundant the non-hydroxylated species. To determine the participation of ArcA and Fnr in the modulation of covalent modifications of lipid A, we generated  $\Delta arcA$  and  $\Delta fnr$  mutant strains and a strain overproducing ArcA (*parcA*). Our results indicate that both regulators are involved in controlling structural changes of lipid A in response to oxygen availability. Additionally, we observed that these regulators control the incorporation of other covalent modifications into lipid A.

LpxO enzyme (encoded by *lpxO* gene) is responsible of the hydroxylation of lipid A in *Salmonella*. Therefore, we studied the relative expression (anaerobic/aerobic) of this gene in wild-type *S. Enteritidis* and their  $\Delta fnr$  and *parcA* derivatives via qRT-PCR. Our results indicate that the expression of *lpxO* depends on oxygen availability, an observation that is consistent with changes in the levels of lipid A hydroxylation described herein. Furthermore, ArcA and Fnr participate in the modulation of the expression of this gene.

The results of this study reveal a change in the hydroxylation degree of *S. Enteritidis* lipid A in response to oxygen availability, in which global regulators ArcA and Fnr are involved. These findings contribute to understanding the molecular mechanisms of adaptation to the environment used by *Salmonella* during infection.

## 1 Introducción

La familia *Enterobacteriaceae* corresponde a un conjunto de bacterias Gram negativo que incluye a los representantes del género *Salmonella*. Este género está compuesto por 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 *et al.*, 2000). La especie *S. enterica* agrupa algunos serovares que se han especializado en infectar a un hospedero específico, como *S. Typhi* que corresponde a un patógeno exclusivo del ser humano, y otros que pueden infectar un amplio rango de hospedero, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, que también son patógenos del ser humano. Estos tres serovares son los más estudiados debido a su importancia en la salud pública, ya que son los principales agentes etiológicos de fiebre tifoidea y gastroenteritis a nivel mundial (Santos *et al.*, 2001).

Actualmente, *S. Enteritidis* es la principal causa de salmonelosis por consumo de alimentos contaminados en Chile y el mundo (Fica *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2002; Roberts y Sockett, 1994; Guard-Petter, 2001). Esta enfermedad se caracteriza por un cuadro de diarrea, fiebre y dolor abdominal. Tal como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* presenta un amplio rango de hospedero, siendo capaz de infectar roedores, humanos y aves de corral. Estas últimas son consideradas el reservorio ambiental más importante de *S. Enteritidis*, ya que desarrollan una colonización sistémica que no manifiesta síntomas y los seres humanos adquieren la enfermedad gastrointestinal al consumir aves enfermas, aparentemente sanas, o huevos contaminados (Guard-Petter, 2001).

El mecanismo por el cual *S. Enteritidis* infecta a sus hospederos no se ha estudiado en detalle, pero se presume que es similar al de *S. Typhimurium*, que es el serovar de *Salmonella* más estudiado. Ambos serovares causan una enfermedad gastrointestinal en humanos; sin embargo, en ratones *S. Enteritidis* produce una infección intestinal limitada, mientras que *S. Typhimurium* produce una enfermedad sistémica, similar a la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* en humanos (Galán, 1996). El ciclo infeccioso de *Salmonella* comienza con la ingestión

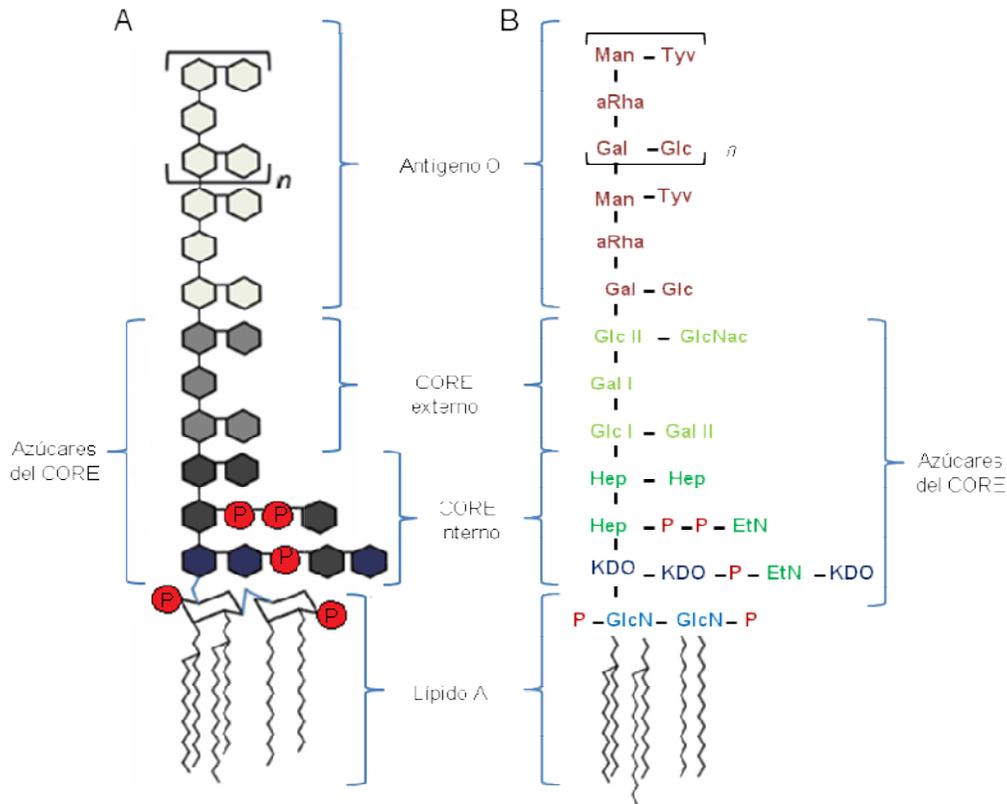
de agua o alimentos contaminados con la bacteria. En el estómago, ésta es capaz de resistir el pH ácido y pasar rápidamente al intestino delgado. En el íleon, a través de las células M de las placas de Peyer y de células del epitelio intestinal alcanza el subepitelio, donde es fagocitada principalmente por macrófagos. El reconocimiento de la bacteria por los macrófagos induce la expresión de genes proinflamatorios, lo que causa un infiltrado rápido de polimorfonucleares, predominantemente neutrofilos (Nau *et al.*, 2003; Rosenberger *et al.*, 2000). Esta respuesta inflamatoria provoca la eliminación de la bacteria y necrosis de la mucosa apical en el íleon y el colon, lo que finalmente desencadena la diarrea inflamatoria (Raffatellu *et al.*, 2006). En el caso de la infección sistémica, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* evaden posteriormente el reconocimiento por el sistema inmune innato y adaptativo del humano o del ratón, respectivamente.

Durante el curso de la infección, *S. Enteritidis* se ve enfrentada a distintos factores ambientales adversos, como la alta osmolaridad del intestino, el pH ácido del estómago o al interior de los macrófagos y cambios en la disponibilidad de oxígeno. Este último es un factor en constante disminución durante el ciclo infectivo (He *et al.*, 1999; Jennewein *et al.*, 2015). Estas distintas condiciones ambientales generan estrés a la bacteria, pero ésta posee mecanismos moleculares de respuesta que le permiten adaptarse y sobrevivir en estos ambientes. En este proceso participan reguladores globales de respuesta, los que habitualmente corresponde a factores transcripcionales capaces de regular la expresión de numerosos genes, incluyendo a los que codifican factores de virulencia. Así, la bacteria no sólo logra adaptarse a la condición ambiental, sino que adquiere un fenotipo adecuado para realizar las diferentes etapas del ciclo infeccioso.

Dentro de los factores de virulencia de *Salmonella* están incluidas moléculas y estructuras de la envoltura bacteriana, como el lipopolisacárido (LPS) (Rhen y Dorman, 2005; Rychlik y Barrow, 2005). El LPS es la molécula más abundante de la membrana externa de las bacterias Gram negativo. Además, corresponde a la primera barrera entre la bacteria y el medio ambiente, y es capaz de interactuar

directamente con diversas células y elementos del sistema inmune del hospedero. Consecuentemente, el LPS constituye el antígeno bacteriano inmunodominante, siendo responsable de las manifestaciones tóxicas de las bacterias Gram negativo y de algunos de los efectos patológicos generados por las infecciones con este tipo de bacterias (Raetz, 1990; Raetz et al., 1991; Raetz, 1993; Rietschel *et al.*, 1994; Raetz y Whitfield, 2002).

El LPS de *Salmonella* es un glicolípido complejo, constituido por tres dominios estructurales: el antígeno O (AgO), la región del CORE y el lípido A (**Figura 1**). El AgO está compuesto de unidades repetidas de un oligosacárido (de 3 a 6 unidades de azúcar) que se proyecta hacia el exterior de la superficie bacteriana y determina la especificidad serológica del LPS, por lo que se denomina también antígeno somático (Reeves, 1993). En *S. Enteritidis*, el AgO está constituido por repeticiones de un pentasacárido formado por unidades de manosa, ramnosa, galactosa y glucosa, comunes a todos los representantes del género *Salmonella*, más la desoxihexosa tivelosa (Verma y Reeves, 1989) (**Figura 1B**). Este componente está unido covalentemente a la región del CORE, un oligosacárido fosforilado constituido al menos por un residuo de ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (KDO), considerado un marcador de LPS, heptosas y hexosas. A su vez, el CORE se une al lípido A, que constituye el ancla hidrofóbica del LPS en la membrana externa. El lípido A cumple un rol fundamental en la protección y defensa bacteriana frente al hospedero y es responsable de la actividad tóxica del LPS, por lo que también se denomina endotoxina (Rietschel *et al.*, 1994). La toxicidad del lípido A en mamíferos reside en su capacidad de actuar como un potente estimulador del sistema inmune innato a través del reconocimiento por parte de los receptores TLR4. Estos efectos varían desde una respuesta aumentada para eliminar la infección, hasta una respuesta masiva y descontrolada que puede causar un *shock* séptico (Silipo y Molinaro, 2011).



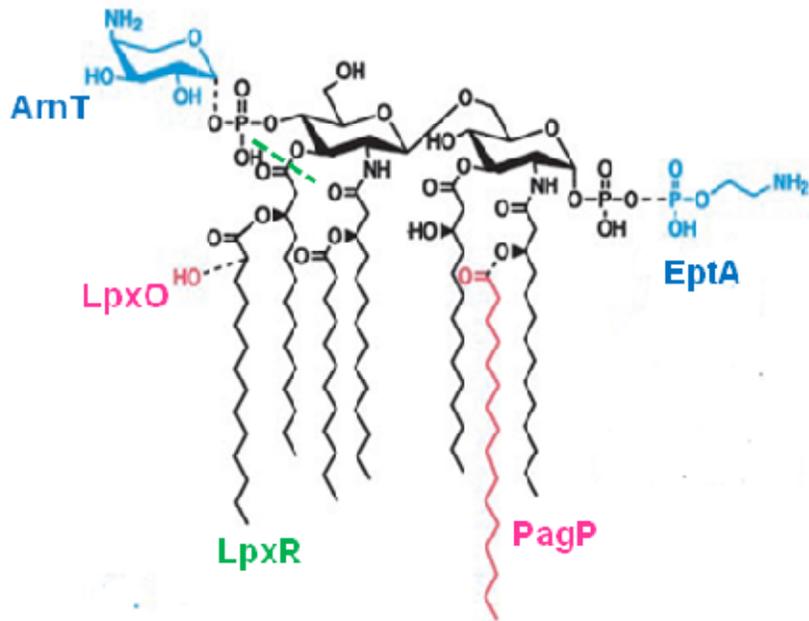
**Figura 1: Estructura del lipopolisacárido (LPS) de *S. Enteritidis*.**

(A) Estructura esquemática del LPS de *S. Enteritidis* basado en Maeshima y Fernandez (2013). En la imagen se muestran los distintos dominios del LPS: Antígeno O, CORE (externo e interno) y lípido A canónico con seis cadenas aciladas y un grupo fosfato en el carbono 1 y otro en el 4' (ver descripción en el texto para mayor claridad). (B) Composición de los azúcares y moléculas que conforman el LPS. Man: manosa, Rha: ramnosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Tyv: tivelosa, GlcNac: N-acetilglucosamina, Hep: heptosa, KDO: ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico, EtN: etanolamina, GlcN: glucosamina, n: número de unidades repetidas del AgO, P: grupo fosfato.

Varios estudios indican que la producción y estructura del LPS es regulada en respuesta a distintos estímulos ambientales. Por ejemplo, se ha demostrado que el grado de polimerización del AgO se incrementa cuando *S. Typhimurium* es incubada en presencia de suero inactivado o en medios de cultivo con baja concentración de hierro (Murray et al, 2005). También se demostró que el grado de polimerización del AgO cambia cuando *S. Typhimurium* se expone a una baja concentración de magnesio y hierro, fenómeno que requiere los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB (Delgado *et al.*, 2006). Estos estudios

además muestran que las modificaciones mencionadas confieren una mayor resistencia de las bacterias al suero.

Por su parte, el lípido A tiene una estructura característica constituida por un disacárido de D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -(1-6), bis-fosforilado en los carbonos 1 y 4' y que se encuentra hexaacilado con ácidos grasos de 12 a 14 átomos de carbono de longitud que se distribuyen de forma asimétrica (Erwin y Munford, 1990; Raetz, 1990; Raetz y Whitfield, 2002) (**Figura 2**). Esta estructura de lípido A es a menudo referida como canónica y es descrita como la que mejor induce la activación de TLR4 en células humanas, en comparación con otras estructuras de lípido A (Hold y Bryant, 2011). Sin embargo, se conoce que esta estructura es dinámica y puede sufrir modificaciones, tales como: cambios en el largo o cantidad de cadenas aciladas o modificaciones covalentes que sustituyen los grupos fosfato (**Figura 2**). Estas variaciones en la estructura canónica del lípido A, le permite a la bacteria resistir a péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMP) como la polimixina B. Sustituyentes como 4-amino-4-desoxi- $\alpha$ -L-arabinosa ( $\alpha$ -L-Ara4N) y fosfoetanolamina forman ésteres con los grupos fosfato (reacciones catalizadas por las enzimas ArnT y EptA, respectivamente), lo que disminuye la carga negativa de la envoltura bacteriana, desfavoreciendo su interacción con los CAMP (Zhou *et al.*, 2001; Wang y Quinn 2010). La bacteria también es capaz de modificar el número de cadenas aciladas que sustituyen la GlAcNac, como la incorporación de un grupo palmitato (C16) catalizado por PagP, lo que también le confiere a la bacteria resistencia a CAMP como la polimixina B (Wang y Quinn, 2010). Estos cambios estructurales no sólo le otorgan a la bacteria propiedades de resistencia a agentes antimicrobianos, sino que también afectan la estructura tridimensional del lípido A, lo que provocaría un cambio en el reconocimiento por parte de los TLR4. En este marco, se ha descrito que LpxR es la enzima capaz de remover la cadena acilada ubicada en el carbono 2' del esqueleto de la D-glucosamina (**Figura 2**), lo que influye directamente en la capacidad del LPS para estimular al receptor TLR4 (Kawasaki *et al.*, 2012). Un resumen de las modificaciones mencionadas se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2: Estructura del lípido A.**

El esquema muestra, en color negro, el lípido A canónico sin modificaciones. Se observa el disacárido de D-glucosamina, que forma el esqueleto central de la molécula sustituida en los carbonos 1 y 4' por grupos fosfato. Se muestran también las cadenas aciladas distribuidas de manera asimétrica en la molécula y que ocupan los carbonos 2, 3, 2' y 3' del disacárido. Además, se muestran en colores algunas modificaciones covalentes sufridas por la estructura canónica y las enzimas responsables de estas modificaciones: En azul, se muestran esterificaciones sobre los grupos fosfato; en rosa se muestra las modificaciones sobre los ácidos grasos (hidroxilación o la incorporación de una cadena acilada); la línea discontinua verde, indica que la enzima remueve ese grupo del lípido A (Basado en la imagen de Zhou *et al.*, 2001).

Las modificaciones que sufre el lípido A también están supeditadas a los cambios en el medio ambiente de la bacteria. Se sabe que en condiciones de bajo pH y baja concentración de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se activa el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Groisman *et al.*, 1989; Garcia Vescovi *et al.*, 1997) y éste a su vez puede activar bajo estas mismas condiciones a un segundo sistema de dos componentes, PmrA/PmrB (Groisman, 1998). Estos sistemas modulan la expresión de los genes que codifican algunas de las enzimas mencionadas: ArnT, EptA y PagP. Esta respuesta adaptativa es de gran relevancia, ya que las condiciones ambientales mencionadas se asemejan a las que *Salmonella* enfrenta al interior de células fagocíticas, como los macrófagos (Gibbons *et al.*, 2005; Rhen y Dormán, 2005).

Otra modificación que sufren los grupos acilo del lípido A es la hidroxilación de un miristato (2-hidroximiristato) que depende de la enzima LpxO. Esta proteína de 302 aminoácidos está codificada en el gen *lpxO*, y posee gran similitud de secuencia con una aspartil/asparaginil  $\beta$ -hidroxilasa de mamíferos que tiene una actividad de dioxigenasa dependiente de  $\text{Fe}^{2+}$ / $\alpha$ -cetoglutarato (Gibbons *et al.*, 2000). Diversos estudios se han realizado para establecer si esta enzima es regulada de alguna manera. Se cree que el sistema PhoP/PhoQ estaría implicado en ello, ya que experimentos de espectrometría de masas y de expresión génica con cepas mutantes  $\Delta$ *phoPQ* y PhoP que actúa de manera constitutiva, señalan cambios en el nivel de hidroxilación del lípido A de *S. Typhimurium*, atribuibles a LpxO, o en la abundancia del transcrito que codifica esta enzima (Guo *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2000). Sin embargo, otros experimentos realizados en condiciones en que PhoP/PhoQ no debería estar activo indican que este sistema no estaría involucrado en la regulación de la actividad de LpxO o su expresión génica (Gibbons *et al.*, 2005). Un aspecto interesante en el contexto de este estudio es que la formación de 2-hidroximiristato en el lípido A depende del oxígeno disponible en el medio, ya que éste es uno de los sustratos de la reacción catalizada por la enzima LpxO (Gibbons *et al.*, 2000).

Una de las condiciones que prevalecen durante la infección por *Salmonella* es una baja tensión de oxígeno, tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico. Esto tiene gran relevancia para la bacteria ya que, por ejemplo, se sabe que *S. Typhimurium* crecida bajo limitación de oxígeno es más invasiva y presenta una mayor adherencia a células de mamíferos que las crecidas aeróbicamente (Lee y Falkow, 1990). Por lo tanto, la adaptación metabólica a la variación de oxígeno juega un papel importante en la virulencia de *S. enterica* (Rychlik y Barrow, 2005). En la bacteria, la transición desde un ambiente aeróbico a uno anaeróbico involucra cambios en la expresión de un gran número de genes. Este complejo sistema regulatorio se ha estudiado extensamente y el principal regulador de este proceso es el factor transcripcional Fnr (*fumarate and nitrate reductase activator*) (Kiley y Beinert, 1998; Sawers, 1999; Ravcheev *et al.*, 2007). Fnr posee centros de Fe-S capaces de detectar directamente el oxígeno disponible (Kiley y Beinert, 2003). Su

papel fisiológico se relaciona principalmente con la optimización de la producción de energía en condiciones anaeróbicas: induce genes que codifican proteínas participantes en el metabolismo fermentativo y en la utilización de aceptores de electrones alternativos y reprime genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo aeróbico, actuando mayoritariamente como represor (Shalel *et al.*, 2005). Otro factor que participa en la adaptación bacteriana a condiciones limitantes de oxígeno es el sistema de dos componentes ArcA/ArcB (*aerobic respiration control*). ArcB es una proteína de transmembrana que actúa como sensor del estado *redox* de la célula, la cual se autofosforila cuando el oxígeno comienza a ser limitante, para luego transferir este grupo fosfato a ArcA. De esta forma, ArcA forma un dímero de tetrámeros de ArcA y ArcA fosforilado (ArcA-P) y es con esta conformación que se une a las regiones promotoras de diversos genes (Jeon *et al.*, 2001). Al igual que Fnr, ArcA puede reprimir o activar la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético: reprime genes que codifican enzimas que participan del ciclo de Krebs y activa genes que codifican proteínas involucrados en el metabolismo fermentativo. También regula la expresión de algunos genes asociados con virulencia y motilidad, entre otros (Matthew *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar si la disponibilidad de oxígeno afecta la producción y/o la estructura del LPS en *S. enterica*. Estudios realizados en *S. Enteritidis* muestran que la disponibilidad de oxígeno regula el grado de polimerización del AgO cuando la bacteria crece en medio mínimo. Además, nuestros datos demuestran que tanto Fnr como ArcA están directamente involucrados en la regulación de este proceso (Silva *et al.*, 2016). Complementario a esto, estudios bioinformáticos indican que los promotores de los genes que codifican las enzimas ArnT, EptA, LpxO y PagP poseen sitios de unión para los factores transcripcionales Fnr y/o ArcA. Con estos antecedentes, podemos relacionar a Fnr y ArcA con una posible regulación de las enzimas que modifican el lípido A, siendo esta una molécula de gran importancia para la defensa, protección y toxicidad de la bacteria, e inducción de la respuesta inmune en el hospedero.

## **Hipótesis**

De acuerdo con los antecedentes presentados, se propone como hipótesis de esta Memoria:

El lípido A de *Salmonella* Enteritidis sufre modificaciones covalentes en respuesta a la disponibilidad de oxígeno. Estas modificaciones dependen de enzimas cuya expresión génica es regulada por los factores transcripcionales ArcA y/o Fnr.

## **Objetivo General**

Determinar las distintas modificaciones que sufre el lípido A de *Salmonella* Enteritidis en respuesta a la disponibilidad de oxígeno y la participación de los reguladores ArcA y/o Fnr en este proceso y en la regulación de la expresión génica de algunas las enzimas involucradas en las modificaciones.

## **Objetivos Específicos**

1. Caracterizar las distintas modificaciones que presenta el lípido A de *Salmonella* Enteritidis en respuesta a la presencia y ausencia de oxígeno.
2. Determinar la participación de ArcA y/o Fnr en la generación de modificaciones del lípido A en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.
3. Determinar el rol de ArcA y Fnr en la regulación de la expresión génica de alguna de las enzimas responsables de las modificaciones del Lípido A.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Reactivos

De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU)\_se obtuvo: estándares de peso molecular de 100 pb y 1 kb.

De Fermelo S.A. se obtuvo: oligonucleótidos partidores (ver **Tabla 3**) y tinción para ácidos nucleicos “*SafeView*”.

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

De Kapa Biosystems (Wilmington, MA, EEUU) se obtuvo: sistema comercial para qRT-PCR “*KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal*”.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: cloruro de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, acetato de sodio, fosfato de amonio y sodio tetrahidratado, glucosa, cloroformo, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, glicerol, ácido clorhídrico fumante, isopropanol, ácido acético glacial, ácido peryódico, hidróxido de sodio, amoníaco 25%, nitrato de plata, ácido bórico, formaldehido, etanol absoluto, fosfato monoácido de potasio trihidratado, metanol, triptona, extracto de levadura, Bacto-Agar, sodio tetrahidratado y filtros Millipore de 0,025 µm.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: “*GoTaq Green Mastr Mix*” y sistema comercial para purificación de RNA “*Wizard SV Total RNA isolation system*”.

De Qiagen (Hilden, Alemania) se obtuvo: sistema comercial para purificación de productos de PCR “*QIAquick PCR purification kit*”, sistema comercial para extracción de DNA plasmidial “*QIAprep Spin Miniprep kit*” y DNasa libre de RNasa

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina (Kan), ampicilina (Amp), cloranfenicol (Cam), arabinosa, azul de bromofenol, xilencianol, proteinasa K, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ribonucleasa A y sistema comercial de extracción de DNA genómico “*GenElute Bacterial Genomic DNA kit*”.

De US Biological (SWAMPSCOTT, MA, EEUU) se obtuvo: dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris base y tricina.

De Winkler (Lampa, Santiago, Chile) se obtuvo: fenol saturado ácido.

## 2.2 Cepas Bacterianas

**Tabla 1:** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o característica	Origen
<i>Salmonella</i> Typhi $\Delta waaL$	$\Delta waaL::FRT$	stock del laboratorio
<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2	cepa silvestre	stock del laboratorio
<i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s	cepa silvestre	stock del laboratorio
<i>Salmonella</i> Enteritidis NCTC13349	cepa silvestre	stock del laboratorio
NCTC13349 $\Delta arcA$	$\Delta arcA::FRT$	stock del laboratorio
NCTC13349 <i>parcA</i>	NCTC13349 transformada con pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>arcA</i> de <i>S. Enteritidis</i>	stock del laboratorio
NCTC13349 $\Delta fnr$	$\Delta fnr::FRT$	stock del laboratorio
NCTC13349 $\Delta fnr/pfnr$	NCTC13349 $\Delta fnr::FRT$ transformada con pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>arcA</i> de <i>S. Enteritidis</i>	stock del laboratorio
NCTC13349 $\Delta /pxO::Cam$	$\Delta /pxO::Cam$	este trabajo
NCTC13349 $\Delta /pxO$	$\Delta /pxO::FRT$	este trabajo
NCTC13349 $\Delta pagP::Kan$	$\Delta pagP::Kan$	este trabajo
NCTC 13349 $\Delta pagP$	$\Delta pagP::FRT$	este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> phi80 <i>lacZ</i> M15 <i>endA recA hsdR</i> (r <sub>K</sub> m <sub>K</sub> ) <i>supE thi gyrA relA</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169$	stock del laboratorio
<i>E. coli</i> BW25113/pKD46	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787 lacIp-4000(lacI^Q) l- poS396(Am) rph-1 \Delta(rhaD-rhaB) 568 rmB-3 hsdR514 / pKD46$	Datsenko y Wanner, 2000

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir/pCLF4	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 lambda pir / pCLF4</i>	Datsenko y Wanner, 2000
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir/pCLF2	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 del(lac-argF)U169 deoR phi80 del(lac)M15 lambda pir / pCLF2</i>	Datsenko y Wanner, 2000
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pCP20	F <sup>-</sup> <i>phi80 lacZM15 endArecAhsdR(r<sub>K</sub> m<sub>K</sub>) supE thi gyrA relA <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 / pCP20</i>	Datsenko y Wanner, 2000

### 2.3 Plasmidios

**Tabla 2:** Plasmidios utilizados en este trabajo.

Plasmidio	Características	Fuente o referencia
pKD46	<i>bla P<sub>BAD</sub> gam bet exo oriR<sub>pSC101</sub>(TS), Amp<sup>R</sup></i>	Datsenko y Wanner, 2000
pCLF2	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS2 oriR6K, Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, promotor T7</i>	stock del laboratorio
pCLF4	<i>bla FRT cam FRT PS1 PS2 oriR6K, Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, promotor T7</i>	stock del laboratorio
pCP20	<i>bla cat cl857 IPR flp pSC101 oriTS, Amp<sup>R</sup>, Cam<sup>R</sup></i>	Datsenko y Wanner, 2000
pBAD-TOPO	vector de clonamiento, Amp <sup>R</sup>	Promega
<i>parcA</i>	pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>arcA</i> de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349, Amp <sup>R</sup>	stock del laboratorio
<i>pfnr</i>	pBAD-TOPO que posee clonado el gen <i>fnr</i> de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349, Amp <sup>R</sup>	stock del laboratorio

### 2.4 Partidores

**Tabla 3:** Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' a 3')
lpxOH1P1	<u>AAGGACAGTGACGTTATGTTTCGCAGCAGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
lpxOH2P2	<u>TACCGCCGGCCGGCTTCAGAGGAGGCTCATATGAATATCCTCCTTAG</u>
lpxOout5	TTTCATCTCCATCATGCCAA
lpxOout3	CGGATGGATAGACTCAAGGC
pagPH1P1	<u>CAATTACGGCTTGAGCAGACCTATGATCCCCTGCAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
pagPH2P2	<u>GCTGTTTTCAATAGTAATATACTTACCTTTCATATGAATATCCTCCTTAG</u>
pagPout5	CGCCATGAAGGCTATCTTTTATTAT
pagPout3	CAGAAGATAACATCAATGGTTTAGC

qrpoDF	TGAAGTGTTCAAACAGTTCCGTCT
qrpoDR	AGACCGGTCTCTTCTTCAATCTGC
qpIdAF	CACGAACACCAGCGATCTGAA
qpIdAR	TGGTTGTAGCCCATCTCTACGTC
qlpxOF	ACGGCATTTCAGAGTCGCA
qlpxOR	GGCATAGGGGTCGCGATGTT
qpagPF	CGGCGGATAAAGGGTGGTTT
qpagPR	TATCGTCTTCCAGCGGTCGC

Secuencia subrayada corresponde a la secuencia homóloga a P1 y P2 de los plasmidios pCLF2 y pCLF4

## 2.5 Condiciones y medios de cultivo

Rutinariamente, las distintas cepas de *S. Enteritidis* se mantuvieron aisladas en placas de agar LB suplementado con antibiótico, según sea el caso.

Para iniciar un experimento, a partir de una colonia aislada se sembró un preinóculo en un tubo con 5 mL de caldo LB y se incubó toda la noche a 37°C, sin agitación. Desde este preinóculo, se sembraron los cultivos aeróbicos y anaeróbicos en medio mínimo E (0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g/L ácido cítrico monohidratado, 10 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O, 3.5 g/L NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> x 4H<sub>2</sub>O), suplementado con 0,2 % glucosa. En ambos casos se utilizó una dilución 1/100. Los cultivos aeróbicos (+O<sub>2</sub>), se realizaron en matraces y se incubaron a 37°C, con agitación. Por su parte, para los cultivos anaeróbicos (-O<sub>2</sub>) se usó tubos o matraces que se incubaron a 37°C dentro de una jarra de anaerobiosis (BBL GasPak System). Para generar la condición de anaerobiosis dentro de la jarra se usó el sistema Anaerogen (Oxoid).

Para la extracción de lípido A, se realizaron cultivos en 50 mL de medio mínimo E. Éstos se inocularon realizando una dilución 1/100 desde un precultivo crecido en 5 mL de medio LB a 37°C sin agitación durante toda la noche. Los cultivos aeróbicos se hicieron en matraces de 250 mL, mientras que para los cultivos anaeróbicos, se utilizaron tubos de centrifuga de 50 mL. Para la extracción de RNA, se utilizó el mismo medio y condiciones descritas, salvo que ambos cultivos, se realizaron en un volumen de 25 mL de medio en matraces de 100 mL.

## **2.6 Extracción de LPS y lípido A**

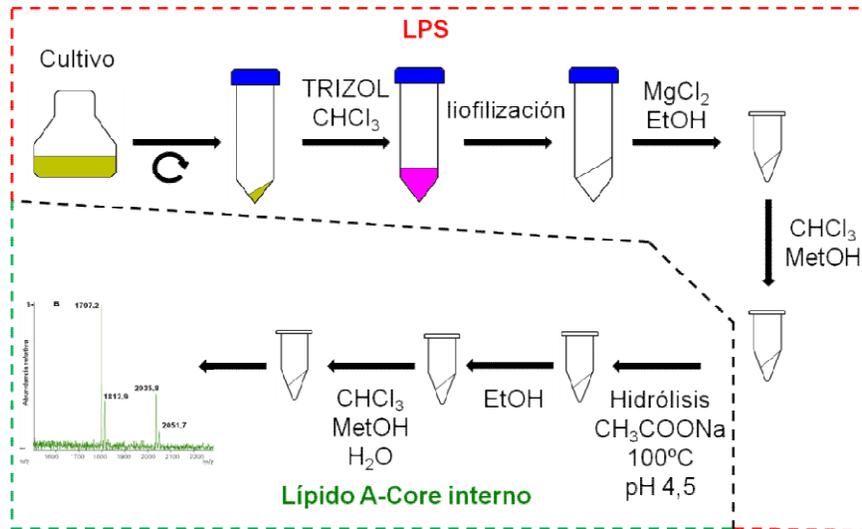
### **2.6.1 Extracción de LPS**

Las cepas se crecieron bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600} \approx 0,3$ . Luego, las bacterias se colectaron por centrifugación a 3420 x *g* durante 10 min y se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo fresco. Se midió la  $DO_{600}$  y se tomó un volumen equivalente a 1,5 mL de suspensión, ajustada a  $DO_{600}$  de 2 y se centrifugó a 18320 x *g* durante 2 min. Luego, el sedimento obtenido se resuspendió en 90  $\mu$ L de tampón de lisis (SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 4 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,01%, Tris 1 M pH 6,8 10 ml de solución final) y se hirvió durante 10 min en un baño de agua. Cada lisado fue tratado con 10  $\mu$ L de proteinasa K 10 mg/mL a 60°C durante 90 min (Marolda et al., 2006). Las muestras se guardaron a 4°C hasta su análisis posterior.

### **2.6.2 Extracción de lípido A**

La obtención del lípido A para su posterior análisis mediante espectrometría de masas consta de varias etapas y se basa en los procedimientos descritos por Caroff y Novikov (2011) y por Yi y Hackett (2000), con algunas modificaciones. Ver esquema de la **figura 3**.

**Día 1:** Después de crecer el cultivo, este se centrifugó en tubos de centrifuga de 50 mL a 3420 x *g* durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionó 2 mL de TRIzol y se resuspendió el sedimento utilizando un vortex. Se agregó 400  $\mu$ L de  $CHCl_3$  y se mezcló con vortex asegurándose de una completa homogenización y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente. Se cambió la solución a tubos de centrifuga de 15 mL y se centrifugó a 3420 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente, se transfirió la fase acuosa a otro tubo de centrifuga de 15 mL, con precaución de no tomar nada de la fase intermedia ni de la inferior. La fase acuosa, que contiene el LPS, se liofilizó para continuar con la extracción.



**Figura 3: Esquema de la purificación de LPS y obtención de lípido A.**

Se indican los pasos realizados para obtener lípido A mediante el protocolo adaptado en este estudio. La primera parte del procedimiento (destacado en rojo) muestra los pasos para la obtención de LPS integro. En verde se destacan los pasos requeridos para obtener lípido A para su posterior análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

**Día 2:** Después de la extracción, se limpió el LPS seco de los restos de la solución que contenía TRIZOL/ $\text{CHCl}_3$ . Para esto, se resuspendió en 1 mL de  $\text{MgCl}_2$  0.375 M en etanol 95% (previamente enfriado a  $-20^\circ\text{C}$ ) en el mismo tubo de centrifuga, asegurando la completa homogenización. Luego, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a  $3280 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento se lavó dos veces con etanol 95%, centrifugando a  $3280 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$  cada vez. Finalmente, se agregó al tubo 1 mL de etanol 100%, se resuspendió y centrifugó a  $3280 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , se descartó el sobrenadante y se procedió con la extracción de Folch.

Después de los lavados con  $\text{MgCl}_2$  y etanol, aún pueden quedar ciertas impurezas en la preparación, las que pueden interferir con la posterior hidrólisis y análisis de lípido A. El objetivo de la extracción de Folch es eliminar fosfolípidos y SDS residuales. Para ello, el LPS se resuspendió en 1 mL del reactivo de Folch ( $\text{CHCl}_3$  y metanol en relación 2:1) utilizando una micropipeta para asegurar la completa homogenización de la muestra. Luego, se centrifugó a  $11000 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$  y se descartó cuidadosamente el sobrenadante usando una micropipeta.

Luego de repetir el procedimiento una vez más, se dejó secar el sedimento en una campana de seguridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

**Día 3:** Después de secar toda la noche, se obtuvo un polvo blanco que corresponde a LPS limpio y puro. Del producto anterior, se tomó una pequeña cantidad que será comparada con el producto de una extracción total de LPS a través de un gel de poliacrilamida, con objeto de comprobar que durante el proceso no se ha perdido la integridad de la molécula. El resto del LPS purificado se sometió a una hidrólisis ácida suave para separar la región del lípido A-CORE del AgO polimérico. Para esto, el LPS se resuspendió en 1 mL de solución de hidrólisis (10 mM acetato de sodio, 1% SDS 1%, pH 4.5), se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se homogenizó usando un vortex. Luego de este paso, se realizó la hidrólisis incubando a 100°C durante 2 horas. Finalmente, después de la hidrólisis se liofilizó el producto.

**Día 4:** Una vez seco el lípido A, se lavó dos veces con una solución que contenía 100 µL de agua destilada y 1 mL de etanol 95% acidificado (100 µL HCl 4 N en 20 mL de etanol 95%). Este producto se centrifugó durante 5 min a 3280 x g. a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó con etanol 95%, se centrifugó a 3280 x g durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se realizó la extracción Bligh-Dyer (Caroff y Novikov 2011). Para esto, se resuspendió el sedimento en una solución que contenía 360 µL de H<sub>2</sub>O, 400 µL de CHCl<sub>3</sub> y 400 µL de metanol. Se centrifugó a 2110 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase orgánica (inferior) en otro tubo para que evaporara el solvente bajo campana de seguridad. Una vez seco, el lípido A sólido purificado está listo para su análisis mediante espectrometría de masa.

## **2.7 Análisis de muestras de LPS y lípido A mediante electroforesis**

Las muestras de LPS y lípido A se analizaron mediante SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 12% (Marolda *et al.*, 2006). Para el gel resolutivo, se mezclaron 1.250 µL de solución que contenía 49,5% acrilamida y 6% bisacrilamida, 1.660 µL de tampón de gel (Tris 3,0 M, SDS 0,3 %, pH 8,45), 520

$\mu\text{L}$  de glicerol, 1.560  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 100  $\mu\text{L}$  de APS 10 % y 6  $\mu\text{L}$  de TEMED. Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo en una cámara Bio-Rad, se cubrió la solución con 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía 49,5 % acrilamida y 3 % bisacrilamida, 775  $\mu\text{L}$  de tampón de gel, 2.100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 75  $\mu\text{L}$  de APS 10 % y 6  $\mu\text{L}$  de TEMED. La cámara de electroforesis se llenó con solución anódica (Tris 0,2 M pH 8,9) y catódica (Tris 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25). En los geles se cargó 1 $\mu\text{L}$  de las muestras de la extracción total y entre 1 a 5  $\mu\text{L}$  de las muestra de LPS purificado o lípido A, por carril. La electroforesis se realizó a 50 V durante 50 min mientras las muestras permanecían en el gel concentrador y luego a 150 V durante 90 min.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó siguiendo el método de Tsai y Frasch (1982), con algunas modificaciones. Una vez retirado el gel de la cámara, se fijó durante toda la noche en 200 mL de una solución que contenía 40 % etanol absoluto y 5 % ácido acético glacial. Se oxidó con agitación durante 10 min con 200 mL de una solución que contenía 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  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se tiñó durante 15 min con una solución que contenía 1 gr  $\text{AgNO}_3$ , 2,8 mL de 0,1 M NaOH, 2 mL de 25 % amoníaco y  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta completar un volumen de 150 mL. El gel se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se reveló de 5 a 20 min (hasta obtener una intensidad que nos permita distinguir las bandas) en 250 mL de una solución que contenía 12,5 mg ácido de cítrico monohidratado y 125  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37 %. Finalmente, la reacción se detuvo con al menos tres lavados de 5 min con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

## **2.8 Análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)**

Las muestras de lípido A se analizaron mediante espectrometría de masas usando un equipo MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). La

adquisición de espectros se realizó en modo ion negativo mediante detección por reflexión. Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Los espectros finales corresponden a la suma de 50 barridos de 30 impactos de láser, aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en una placa portamuestra *micro scout* (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Antes del análisis, cada muestra de lípido A se resuspendió en 90  $\mu$ L de cloroformo/metanol 1:1 v/v (Silipo et al., 2004). Se mezcló cada solución en razón 1:1 con la matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB, 10 mg/mL) en ácido cítrico (AC, 19,2 mg/mL) (Marchet *al.*, 2010). Se depositó 1,5 a 2,0  $\mu$ L de cada mezcla de muestra con matriz DHB-AC en la placa portamuestra. Para el análisis de los espectros de masa obtenidos mediante MALDI-TOF, se utilizó el programa mMass 3 (desarrollado por Martin Strohm, [www.mmass.org](http://www.mmass.org)).

## **2.9 Obtención de mutantes mediante el método de *Red Swap***

### **2.9.1 Extracción de DNA plasmidial**

Se extrajeron los plasmidios pKD46, pCLF2, pCLF4 y pCP20 (**Tabla 2**) desde las cepas descritas en la **Tabla 1**. Para esto, las cepas se cultivaron en 5 mL de medio LB durante toda la noche a 37°C con agitación. Se utilizó el sistema comercial “*QIAprep Spin Miniprep Kit*” (Qiagen) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Finalmente, el DNA plasmidial se resuspendió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

### **2.9.2 Preparación de bacterias electrocompetentes**

Se creció un preinóculo de la cepa que se deseaba transformar en 5 mL de medio LB a 37°C durante toda la noche. Se inoculó 10 mL de medio LB fresco con 100  $\mu$ L del preinóculo y se creció a 37°C con agitación hasta que alcanzara una DO<sub>600</sub> entre 0,4 y 0,6. Luego, se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 18300 x g durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Lo anterior se repitió una vez más y luego se realizaron lavados con agua estéril. Para ello, se resuspendió

suavemente el precipitado del proceso anterior con 1 mL de agua Milli-Q estéril fría. Una vez homogenizada la suspensión, se centrifugó a 18300 x *g* durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron 6 veces y el precipitado final se resuspendió suavemente en 90 µL de agua Milli-Q estéril fría. Las bacterias electrocompetentes se utilizaron inmediatamente.

### **2.9.3 Obtención de productos de PCR para la mutagenesis**

Se diseñaron partidores de 60 nucleótidos, cuyos extremos 5' contenían 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen o región genómica a mutar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos (subrayados en las secuencias incluidas en la **Tabla 3**) cuya secuencia hibrida perfectamente con las regiones P1 y P2 presentes en los plasmidios pCLF4 y pCLF2. Estos plasmidios poseen un *cassette* génico compuesto por el gen *aph* (resistencia a kanamicina) o por el gen *cat* (resistencia a cloranfenicol) respectivamente, flanqueado por la secuencia FRT. La amplificación de este *cassette* se realizó utilizando los partidores lpxOH1P1 y lpxOH2P2 para mutar la el gen *lpxO*, o los partidores pagPH1P1 y pagPH2P2 para mutar el gen *pagP* (**Tabla 3**). El programa de amplificación consistió en una etapa 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 una etapa de elongación final (72°C x 7 min). Los productos de amplificación se purificaron con el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*” de Qiagen. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo al siguiente protocolo:

Tampón de PCR 5X	20 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	6 $\mu$ l
dNTPs 10X [2 mM cada uno]	2 $\mu$ l
Partidor 1 [10 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
Partidor 2 [10 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
DNA [pCLF]	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	68,5 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa [5 U/ $\mu$ L]	0,5 $\mu$ l
Volumen final	100 $\mu$ l

#### 2.9.4 Mutagénesis

La mutagénesis se realizó sobre la cepa *S. Enteritidis* NCTC13349 transformada con el plasmidio termosensible pKD46 (**Tabla 2**). Éste contiene los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago  $\lambda$  bajo el control del promotor *P<sub>araBAD</sub>*, inducible por arabinosa (Datsenko y Wanner, 2000). Para obtener la cepa transformada con el plasmidio pKD46, se prepararon bacterias electrocompetentes como se describió. Se mezclaron 90  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes con 2  $\mu$ l de una preparación de plasmidio pKD46 y se transformó usando un electroporador *E. coli* Pulser (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 1,8 kV. Inmediatamente después de electroporar, se agregó 900  $\mu$ l de medio LB y se incubó a 30°C durante 60 min. Luego, se sembró 200  $\mu$ l de la resuspensión bacteriana sobre placas LB suplementadas con Amp y se incubaron toda la noche a 30°C.

Se seleccionaron 12 colonias resistentes a Amp a partir de la cepa NCTC13349 transformada con pKD46 y se inocularon en un matraz que contenía 20 mL de medio LB suplementado con Amp (100  $\mu$ g/mL) y L-arabinosa (10 mM) para inducir la expresión de la recombinasa Red. Las bacterias se crecieron a 30°C con agitación hasta una DO<sub>600</sub> = 0,4 y se prepararon células electrocompetentes como se describió. Se mezclaron 90  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes con 10  $\mu$ l de producto de PCR concentrado. Las bacterias transformantes se recuperaron en medio LB a 37°C durante 1 h, para luego ser seleccionadas a 37°C en placas LB suplementadas con Kan o Cam, según correspondía. El plasmidio termosensible

pKD46 se eliminó de las mutantes generadas 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 utilizó un partidador externo (out3) a la región reemplazada en combinación con un partidador interno al *cassette* de resistencia utilizado (partidores H1P1) (**Tabla 3**). Como templado se utilizó 2 µl de una suspensión bacteriana obtenida al resuspender una colonia en 50 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q. El programa de amplificación utilizado consistió en una etapa de desnaturación 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 una etapa de elongación final (72°C x 10 min). La amplificación se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Como control se realizó la reacción de amplificación utilizando como templado una suspensión de la cepa silvestre. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo al siguiente protocolo:

Tampón de PCR 5X	2 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	0,6 µl
dNTPs 10X [2 mM cada uno]	0,2 µl
Partidor 1 [10 µM]	0,2 µl
Partidor 2 [10 µM]	0,2 µl
Suspensión bacteriana	2 µl
H <sub>2</sub> O	4,7 µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa [5 U/µl]	0,1 µl
Volumen final	10 µl

### 2.9.5 Eliminación del casete de resistencia

Una vez verificada la inserción del *cassette* de resistencia y la pérdida del plasmidio pKD46, se transformaron las diferentes cepas mutantes con el plasmidio pCP20 (**Tabla 2**). Este plasmidio tiene clonado el gen que codifica la recombinasa FLP, que permite eliminar los genes de resistencia a antibiótico presentes en el *cassette* insertado en las diferentes mutantes, dejando una copia del sitio FRT en el sitio de la mutagénesis (Datsenko y Wanner, 2000). Se seleccionaron ~30

colonias de cada mutante transformada con el plasmidio pCP20, las que se sembraron en placas de agar LB y agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 42°C, durante toda la noche. Esto se repitió hasta obtener mutantes que crecieran sólo en la placa que no contenía el antibiótico de selección para comprobar que cada cepa perdiera la resistencia a Cam o Kan.

## **2.10 Electroforesis en geles de agarosa**

Para el análisis de muestras de DNA, se prepararon geles usando agarosa a concentración 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Para el análisis de muestras de RNA se usaron geles de agarosa al 1% en tampón TAE preparado con agua Milli-Q estéril tratada con DEPC 10 mM. Las muestras de DNA o RNA se mezclaron con el volumen adecuado de tampón Blue II 10X (glicerol 20% [v/v], azul de bromofenol 0,25% [p/v], xilencianol 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 las bandas de DNA o RNA se visualizaron sobre un transiluminador UV.

## **2.11 Extracción de mRNA**

Se usaron 250 µL de un preinóculo de bacterias crecidas en medio LB a 37°C durante toda la noche para inocular 25 mL de medio mínimo E suplementado con glucosa 0,2%. Las bacterias se crecieron a 37°C en aerobiosis o anaerobiosis hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,35 y 0,3 respectivamente. En este punto, se incubaron los cultivos en hielo para detener el crecimiento bacteriano y se transfirieron 5 mL de estos cultivos a un tubo de 15 ml respectivamente rotulado. A estos tubos se les agregó 2 mL de solución stop (etanol 95% y fenol saturado ácido %) y se incubó durante 30 min en hielo. Luego, se centrifugó a 3220 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante por inversión. Con la solución remanente en el tubo se resuspendió el precipitado y la suspensión se transfirió a un tubo de 1,5 mL. Se centrifugó a 18300 x g durante 1 min y se descartó el

sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 200  $\mu$ L de solución tampón de proteinasa K y se agregó 5  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL), luego se incubó a 60°C durante 10 min. Una vez realizados los pasos anteriores, se utilizó el sistema comercial “*SV total RNA Isolation System*” de Promega para extracción de RNA y se procedió según instrucciones del fabricante. Una vez realizada la extracción, se analizó el resultado de las extracciones mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

## 2.12 Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Antes de generar el cDNA, se cuantificó el RNA presente en las muestras extraídas utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Thermos). Una vez realizada la cuantificación de las muestras de RNA, se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada una de ellas:

RNA	0,5 $\mu$ g
<i>Random primer</i> (3 mg/mL)	0,5 $\mu$ L
dNTPs (10mM)	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O DEPC	- $\mu$ L
Volumen final	31 $\mu$ L

La reacción se incubó a 60°C durante 5 min y luego en hielo durante 3 min. Una vez realizado, se le incorpora la siguiente mezcla a cada reacción:

<i>First Strand Buffer</i> 5X	10 $\mu$ L
DTT 0,1M	5 $\mu$ L
RNAsin 40u/ $\mu$ L	2 $\mu$ L
SuperScript II invitrogen	1 $\mu$ L

Para finalizar, se debe incubar por 2 min a temperatura ambiente y luego 2 h a 42°C.

Una vez generado el cDNA de cada cepa, se encuentra listo para realizar el qPCR en un equipo Stratagene MX3000P con los partidores indicados en la **Tabla 3**.

### 2.13 Reacciones de qPCR.

Una vez obtenido el cDNA, se realiza el qPCR preparando la siguiente mezcla de reacción para cada muestra:

SYBER GREEN® 1x	10 µL
Partidor 1 (10 µM)	0,5 µL
Partidor 2 (10 µM)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	8 µL
cDNA	1 µL

En el equipo Stratagene MX3000P se configuro en el modo de cuantificación comparativa y el programa de amplificación utilizado consistió en una etapa de desnaturación inicial (94°C x 10 seg), 40 ciclos de amplificación (94°C x 50 seg; 56°C x 20 seg; 72°C x 1 min y 30 seg) y una etapa de elongación final (72°C x 3 min). También, se utiliza una etapa para calcular la temperatura de fusión de cada producto generado. Esta consta de un primer paso a 94°C x 5 seg; 25°C x 1 seg; 70°C x 15 seg y 94°C x 1 seg. Finalmente, los resultados fueron analizados utilizando el programa REST© (*Relative Expression Software Tool*).

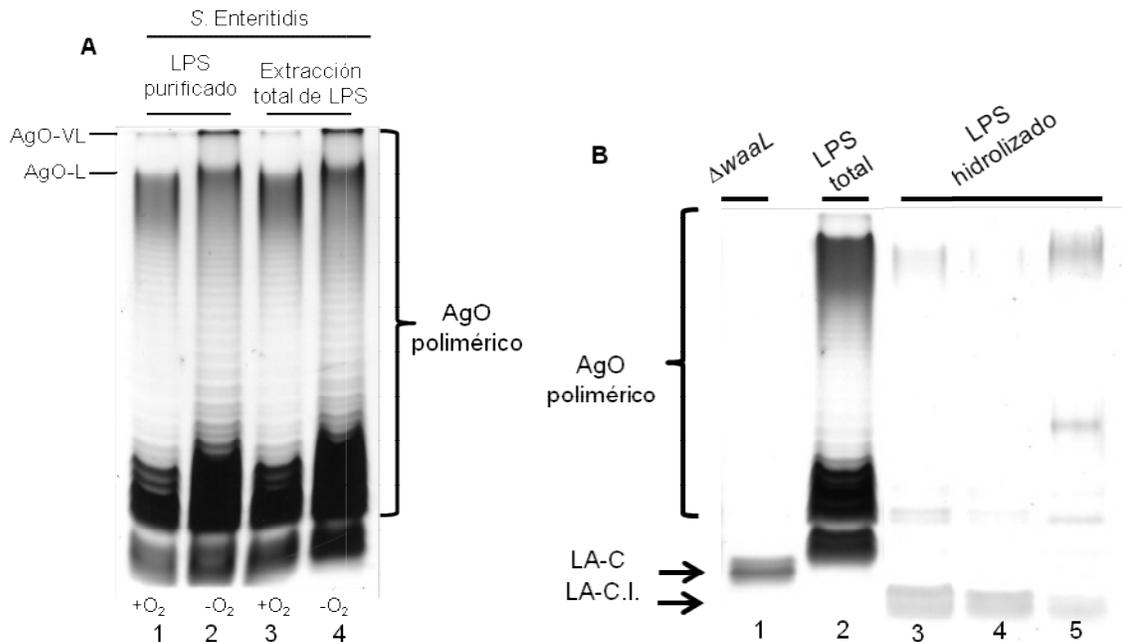
### 3 Resultados

#### 3.1 Objetivo Específico 1.- Caracterizar las distintas modificaciones que presenta el lípido A de *Salmonella* Enteritidis en respuesta a la presencia y ausencia de oxígeno

##### 3.1.1 Implementación de un protocolo para la purificación de lípido A

A la fecha, existen numerosos estudios que analizan el lípido A de *Salmonella enterica*. La gran mayoría de estos estudios han sido realizados usando el serovar Typhimurium como modelo (Gibbons *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2012). En estos trabajos se ha utilizado un método en el que primero se extrae el LPS con TRIzol/cloroformo y luego se obtiene la fracción correspondiente al lípido A-Core interno (lípido A-CI) de la molécula mediante hidrólisis ácida a 100°C. Ésta es la fracción que se analiza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) para determinar sus modificaciones.

Con el fin de identificar las modificaciones en respuesta a la disponibilidad de oxígeno del lípido A del *S. Enteritidis*, primero se debió montar en nuestro laboratorio un método de purificación que permitiera obtener un producto suficientemente puro para su análisis. En primera instancia, comparamos los patrones electroforéticos de preparaciones de LPS completo obtenidas mediante el método de purificación con TRIzol/cloroformo versus la extracción rutinaria de LPS que resulta de la hidrólisis de proteínas de un lisado total de bacterias. El resultado se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (**Figura 4A**).



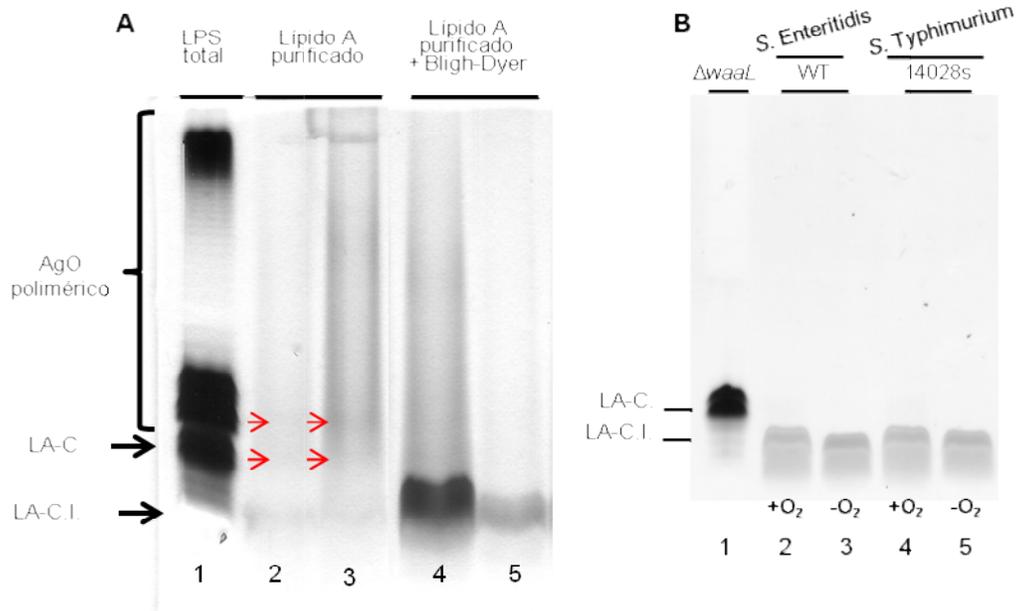
**Figura 4: Perfiles electroforéticos de LPS y LPS hidrolizado. (A)** Perfiles de LPS obtenido mediante purificación con TRIZol/cloroformo (carriles 1 y 2) con el obtenido realizando una extracción total (carriles 3 y 4). **(B)** Producto obtenido luego de realizar hidrólisis ácida a diferentes muestras de LPS purificado (carriles 3 al 5). Como referencia se muestra el LPS de una cepa  $\Delta waaL$  que no liga antígeno O (carril 1) y LPS de la cepa silvestre (carril 2). El LPS se obtuvo de *S. Enteritidis* cultivada en medio mínimo E, en presencia o ausencia de oxígeno. El análisis se realizó en geles de poliacrilamida al 12 %.

del LPS de la cepa silvestre NCTC 13349 crecidas con o sin oxígeno. Se observa que no hay diferencias en los perfiles de las muestras obtenidas mediante los dos métodos. En ambos casos se observó la distribución modal del LPS ya conocida (Silva *et al*, 2016). Por lo tanto, se puede afirmar que el LPS purificado al utilizar TRIZol/cloroformo es comparable con el de la extracción total, por lo que se decidió utilizar este método de purificación para obtener la fracción del lípido A.

De esta forma, se realizó una hidrólisis ácida del LPS obtenido, seguido de lavados utilizando etanol-acidificado y etanol. El producto obtenido correspondería al lípido A más el CORE interno de la molécula (Caroff y Novikov, 2011). Para confirmar esto, el producto hidrolizado y no hidrolizado se analizó mediante electroforesis (**Figura 4B**). Además, se analizó en paralelo una muestra de LPS

obtenida a partir de *S. Typhi*  $\Delta waaL$ . Esta cepa mutante carece de la ligasa que une el AgO al lípido A-CORE, por lo que su LPS corresponde únicamente a lípido A-CORE. Esta muestra permite un control de movilidad electroforética, ya que su migración es ligeramente menor que el lípido A-CI. En la **Figura 4B** se observa que luego de la hidrólisis en todas las muestras analizadas aparece una banda correspondiente al lípido A-CI. (carriles 3 al 5), cuya movilidad es ligeramente mayor que la banda correspondiente al LPS extraído desde la cepa mutante (carril 1). No obstante, la hidrólisis no fue completa ya que aún se observan bandas de menor movilidad que corresponderían a moléculas de LPS no hidrolizado.

De acuerdo a estos resultados, se incorporaron dos modificaciones al protocolo de purificación de lípido A original: una incubación con la solución de hidrólisis a temperatura ambiente, para favorecer la disolución del LPS y el aumento a 2 horas del tiempo de hidrólisis a 100°C. Luego de introducir estas modificaciones, aún se observaron pequeñas cantidades de LPS de bajo peso molecular no hidrolizado (**Figura 5A**, carriles 2 y 3). Para eliminar este material no hidrolizado, luego de los lavados con etanol-acidificado y etanol, se agregó una etapa de extracción orgánica con cloroformo/metanol/agua (reactivo de Bligh-Dyer) (Tirsoaga *et al.*, 2007; Caroff y Novikov, 2011) cuyo objetivo también es concentrar el lípido A. Con esta nueva modificación en el protocolo de purificación se logró aumentar la concentración de lípido A-CI y obtener un material prácticamente libres de LPS completo (**Figura 5A**, carriles 4 y 5).



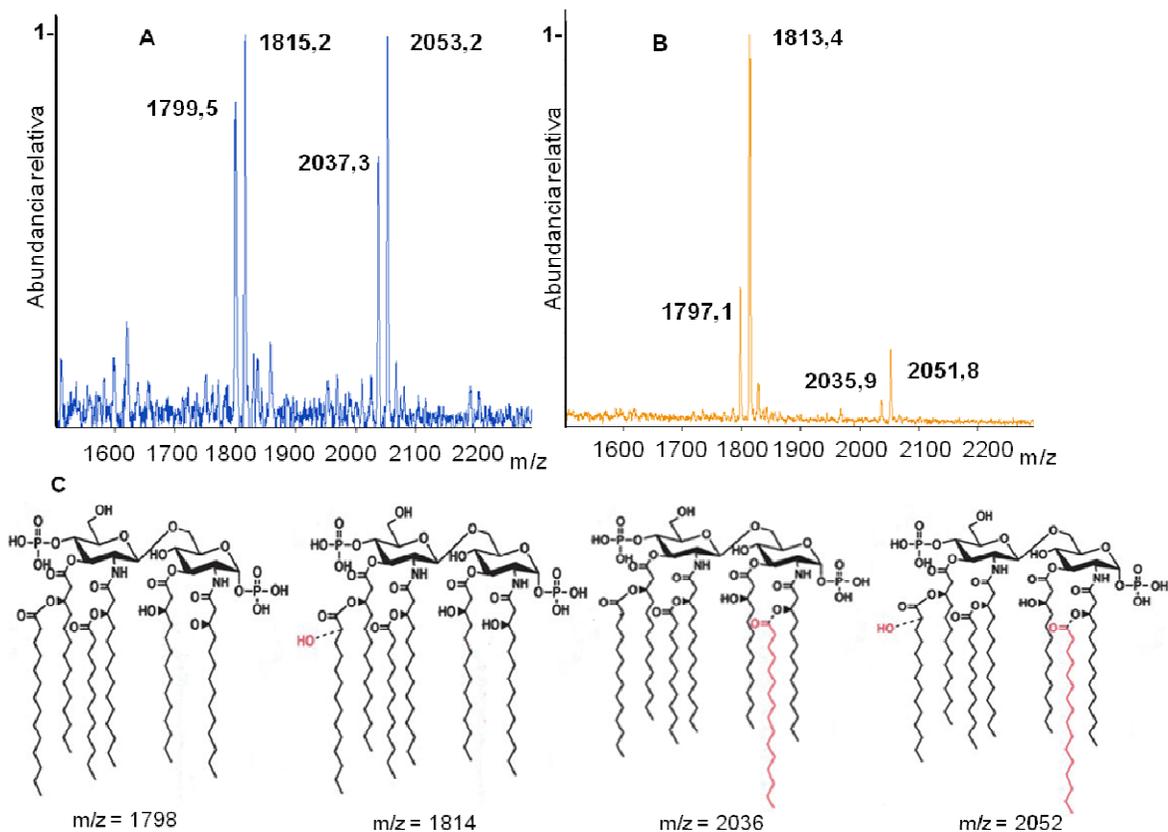
**Figura 5: Perfiles electroforéticos de lípido A obtenido mediante distintos tratamientos.** (A) Los carriles 2 y 3 muestran lípido A con material aun no hidrolizado (flechas rojas). En Los carriles 4 y 5 se aprecia el producto luego de una etapa adicional de extracción con solventes. Como comparación se muestra LPS completo (carril 1). (B) Se muestra el lípido A purificado desde *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* utilizando el protocolo desarrollado en este trabajo. Como referencia se muestra el LPS de una mutante *S. Typhi*  $\Delta waaL$ . Las bacterias se cultivaron en medio mínimo E, en presencia o ausencia de oxígeno. El análisis se realizó en geles de poliacrilamida al 12 %.

Esta última purificación se realizó a partir de 100 o 200 mL de cultivo. Aparentemente, la cantidad de biomasa bacteriana usada fue excesiva, lo que interfirió en la hidrólisis final para la obtención de lípido A puro, ya que el LPS purificado no se disolvía por completo en la solución de hidrólisis (no mostrado). Por esto, a partir de este punto se realizaron las purificaciones incluyendo los cambios indicados a partir de 50 mL de cultivo de *S. Enteritidis* NCTC13349 y de *S. Typhimurium* 14028s (a modo de comparación), crecidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Con estas modificaciones se obtuvo como producto un lípido A-CI suficientemente puro, cuyo análisis electroforético reveló la presencia de una única banda, exenta de moléculas de LPS no hidrozado (Figura 5B, carriles 2 al 5), material que será utilizado para su caracterización mediante espectrometría de masas.

### 3.1.2 Análisis del lípido A mediante espectrometría de masas

Una vez obtenido lípido A puro, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas usando un equipo MALDI-TOF y la matriz DHB-AC. Cabe destacar que no hay trabajos publicados que describan espectros de masas de lípido A obtenido a partir de *S. Enteritidis*, aunque sí los hay en el caso de *S. Typhimurium* (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013). Por este motivo, se analizaron muestras de lípido A obtenidas a partir de ambos serovares, las que se compararon entre sí y con lo descrito en la literatura con el fin de identificar las señales obtenidas.

En primera instancia, se analizaron muestras de lípido A de bacterias crecidas aeróbicamente en medio mínimo E, como las que se presentan en la **Figura 5B**. El análisis por MALDI-TOF de estas muestras se presenta en la **Figura 6**. Al comparar los espectros, en ambos serovares se observan cuatro señales principales que son identificables según la bibliografía. Éstas son respectivamente para *S. Enteritidis* (**Figura 6A**) y *S. Typhimurium* (**Figura 6B**): las señales a 1797,1 m/z y 1799,5 m/z corresponden a lípido A hexaacilado (Kawasaki K. *et al* 2007); las señales a 1813,4 m/z y 1815,2 m/z corresponden a lípido A hexaacilado e hidroxilado (Kawasaki K. *et al* 2007); las señales a 2035,9 m/z y 2037,3 m/z corresponden a lípido A heptaacilado (Kawasaki K. *et al* 2007; lin Guo. *et al* 1997); finalmente, las señales a 2051,8 m/z y 2053,2 m/z corresponden a lípido A heptaacilado e hidroxilado (Kawasaki K. *et al* 2007). Estos resultados indican que el material purificado mediante nuestro protocolo es suficiente como para poder ser analizado por espectrometría de masas y correspondería a lípido A-CI, ya que presenta señales conocidas y caracterizadas en *Salmonella enterica* por otros autores (**Figura 6C** y tabla inserta en la figura).

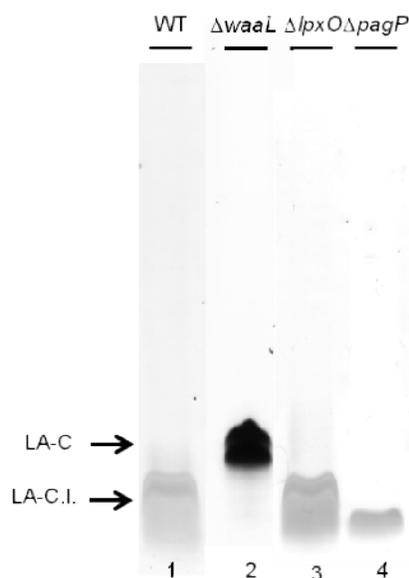


(A) m/z observado S. Typhimurium	(B) m/z observado S. Enteritidis	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1799,5	1797,1	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1815,2	1813,4	1814	Hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2037,3	2035,9	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007/Guo <i>et al</i> 1997
2053,2	2051,8	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 6: Espectros de masa del lípido A de S. Typhimurium y S. Enteritidis.**

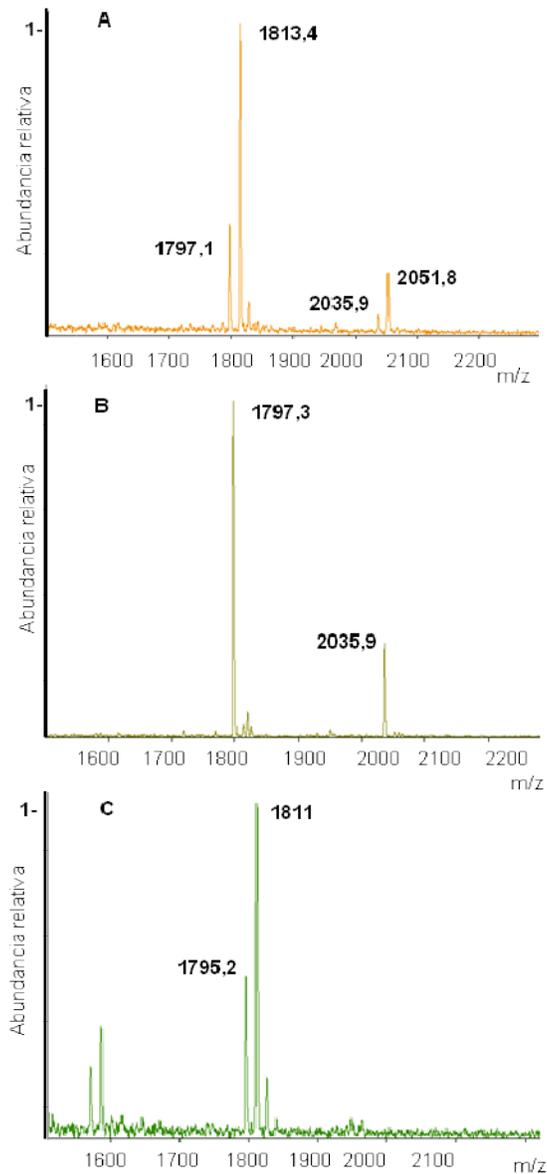
Se muestran los espectros de masas del lípido A obtenido de los serovares S. Typhimurium (A) y S. Enteritidis (B) crecidos en medio mínimo en presencia de oxígeno. Las cuatro señales de alta intensidad detectadas en ambos casos, corresponden a moléculas de lípido A que se muestran en el esquema (C). La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

Para complementar el resultado anterior y establecer sin duda alguna que el producto obtenido con nuestro protocolo de purificación corresponde efectivamente a lípido A-CI, se decidió generar cepas mutantes que carezcan de algunos genes que codifican enzimas responsables de modificar el lípido A. Según lo descrito en la literatura, el lípido A-CI sufre hidroxilaciones y acilaciones que son mediadas por las enzimas LpxO y PagP, respectivamente (Gibbons *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 1998). De este modo, al inactivar los genes *lpxO* y *pagP* se deberían producir cambios predecibles en los espectros de masa del lípido A-CI obtenido a partir de cada mutante. Con esto en mente, se generaron mutantes individuales por delección de los genes *lpxO* y *pagP* en *S. Enteritidis* mediante el método de *Red Swap* (Datsenko y Wanner, 2000). Ambas cepas se crecieron aeróbicamente en medio mínimo E suplementado con glucosa y se les extrajo el lípido A-CI. El producto obtenido de la purificación se analizó mediante SDS-PAGE, comparándolo con el lípido A-CI obtenido de la cepa silvestre y el LPS de la mutante *S. Typhi*  $\Delta waaL$  (**Figura 7**). El resultado de nuestro análisis indica que todas las muestras presentan un lípido A-CI de tamaño esperado. El lípido A-CI de la mutante  $\Delta lpxO$  presentó una movilidad prácticamente indistinguible del de la cepa silvestre, lo que se esperaba dado que en este caso la diferencia de masas corresponde sólo a un grupo hidroxilo (**Figura 7**, comparar carriles 1 y 2). En cambio, el lípido A-CI de la mutante  $\Delta pagP$  presentó una movilidad electroforética mayor que el de la cepa silvestre. Este resultado es consistente con la presencia de un lípido A-CI de menor masa debido a la ausencia de grupos palmitato (**Figura 7**, carril 3).



**Figura 7: Perfiles electroforéticos de lípido A de *S. Enteritidis* y sus derivadas isogénicas  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$ .** Se observa el lípido A obtenido de *S. Enteritidis* y el LPS obtenido de la mutante *S. Typhi*  $\Delta waaL$  (1-2), se comparan con el lípido A de las cepas  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$  (3-4). En la figura se muestra con flechas las posiciones del lípido A-CORE y el lípido A-CORE interno. Las bacterias se cultivaron en medio mínimo E, en presencia o ausencia de oxígeno. El análisis se realizó en geles de poliacrilamida al 12 %.

Los espectros de masas de estas preparaciones se muestran en la **Figura 8**. A diferencia de lo que ocurre para cepa silvestre (**Figura 8A**), en el material purificado desde la mutante  $\Delta lpxO$  sólo existen dos señales detectables (**Figura 8B**). La primera y más intensa se registra a 1797,3 m/z y corresponde a lípido A hexaacilado. La segunda señal se registra a 2035,9 m/z y corresponde a lípido A heptaacilado (**Figura 8B**). Como se esperaba, los *peaks* registrados corresponden a especies de lípido A que no han sufrido hidroxilaciones en sus cadenas aciladas. Por otro lado, el análisis del espectro de masas del lípido A de la cepa  $\Delta pagP$  muestra cuatro señales de alta intensidad (**Figura 8C**), pero sólo a dos de ellas podemos asignar una estructura conocida de acuerdo a la literatura. La primera señal detectada se registra a 1795,2 m/z y corresponde a lípido A hexaacilado. Por su parte, la señal más intensa se registra a 1811 m/z y correspondiente a lípido A hexaacilado e hidroxilado (**Figura 8C**).



(A) m/z observado S. Enteritidis	(B) m/z observado $\Delta lpxO$	(C) m/z observado $\Delta pagP$	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1797,1	1797,3	1795,2	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,4	-	1811	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,9	2035,9	-	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> 1997
2051,8	-	-	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 8: Espectros de masa del lípido A de *S. Enteritidis* y sus derivadas isogénicas  $\Delta lpxO$  y  $\Delta pagP$ .** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de las cepas mutantes  $\Delta lpxO$  (carente de hidroxilaciones) (B) y  $\Delta pagP$  (cepa que ha perdido la capacidad de producir lípido A heptaacilado), cultivadas en condiciones aeróbicas (C). La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

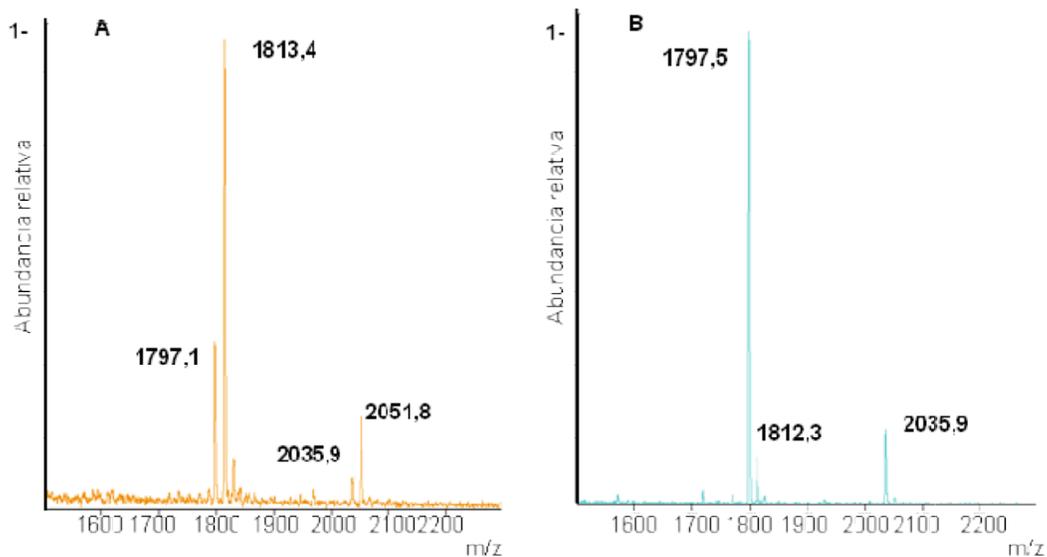
Consecuentemente, y concordante con lo observado en los geles de poliacrilamida, la mutante  $\Delta pagP$  produce un lípido A-CI de menor masa que el de la cepa silvestre y es incapaz de generar la especie heptaacilada, lo que se evidencia en la ausencia de señales próximas a 2036 m/z en el espectro de masas.

Todos estos antecedentes permiten concluir que con nuestro protocolo se obtiene lípido A-CI de calidad óptima para analizar su estructura mediante espectrometría de masas, lo que nos permite realizar experimentos fisiológicos para comprender el efecto del oxígeno sobre la estructura de esta molécula.

### **3.1.3 Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la estructura del lípido A de *S. Enteritidis***

Para determinar si diferencias en la disponibilidad de oxígeno tienen efectos sobre las modificaciones covalentes del lípido A de *S. Enteritidis*, se realizaron cultivos en medio mínimo E suplementado con glucosa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y se obtuvo el lípido A de dichos cultivos. El producto obtenido se analizó inicialmente mediante SDS-PAGE (**Figura 5B**).

Posteriormente, las muestras se analizaron mediante MALDI-TOF. Los espectros de masas se presentan en la **Figura 9**. El espectro correspondiente al material obtenido desde la cepa crecida en aerobiosis presenta las cuatro señales descritas. Estas señales corresponden a lípido A hexaacilado (1797,1 m/z), hexaacilado e hidroxilado (1813,4 m/z), heptaacilado (2035,9 m/z) y heptaacilado e hidroxilado (2051,8 m/z) (**Figura 9A**). La especie mayoritaria fue el lípido A hexaacilado e hidroxilado, seguido por el lípido A hexaacilado. Por su parte, en las especies heptaaciladas también predominó en abundancia la especie hidroxilada, siendo la especie heptaacilada sin modificaciones la menos abundante bajo esta condición. Así, las especies hidroxiladas fueron las más abundantes cuando la bacteria se creció en presencia de oxígeno.



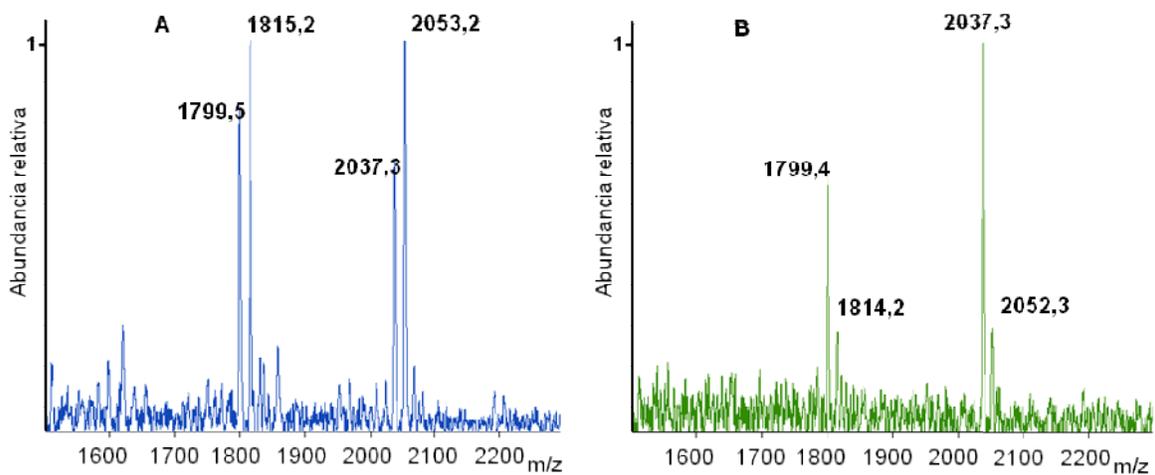
(A) m/z observado +O <sub>2</sub>	(B) m/z observado -O <sub>2</sub>	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1797,1	1797,5	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,4	1812,3	1814	Hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,9	2035,9	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007/ Guo <i>et al.</i> , 1997
2051,8	-	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 9: Efectos de la disponibilidad de oxígeno sobre la abundancia de especies de lípido A de *S. Enteritidis*.** Se muestra el espectro de masas del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* cultivada en presencia (A) o ausencia (B) de oxígeno. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

Por otra parte, el análisis del material obtenido desde la cepa crecida en anaerobiosis reveló con claridad la presencia del sólo tres de las cuatro especies detectadas durante el crecimiento aeróbico: lípido A hexaacilado (1797,5 m/z), lípido A hexaacilado e hidroxilado (1812,3 m/z) y lípido A heptaacilado (2035,9 m/z) (**Figura 9B**). A diferencia del lípido A obtenido en aerobiosis, donde las especies hidroxiladas eran las más abundantes, en anaerobiosis las especies más abundantes fueron las no hidroxiladas, siendo el más abundante el lípido A hexaacilado. Finalmente, el lípido A heptaacilado e hidroxilado (cuya señal característica se registra aproximadamente a 2052 m/z) fue apenas detectable en las bacterias crecidas en anaerobiosis.

Para determinar si el fenómeno observado está restringido sólo en *S. Enteritidis* o si es un fenómeno que ocurre en otros serovares de *S. enterica*, se realizaron cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *S. Typhimurium* 14028s y se analizó su lípido A mediante espectrometría de masas. Los resultados mostraron que, al igual que en el caso de *S. Enteritidis*, la hidroxilación del lípido A en *S. Typhimurium* también es dependiente de la presencia de oxígeno en el cultivo, siendo mayor cuando la bacteria se creció aeróbicamente (**Figura 10A**) que cuando se cultivó anaeróbicamente (**Figura 10B**). Un resultado similar se obtuvo cuando el mismo experimento se realizó con la cepa LT2 de *S. Typhimurium* (no mostrado).

En conjunto, estos resultados indican que en *S. enterica* predominan las especies hidroxiladas del lípido A en aerobiosis, mientras que en anaerobiosis ocurre lo contrario.



(A) m/z observado +O <sub>2</sub>	(B) m/z observado -O <sub>2</sub>	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1799,5	1799,4	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1815,2	1814,2	1814	HEX / hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2037,3	2037,3	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 / Guo <i>et al.</i> , 1997
2053,2	2052,3	2052	HEP / hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 10: Efectos de la disponibilidad de oxígeno sobre la abundancia de especies de lípido A de *S. Typhimurium*.** Se muestra el espectro de masas del lípido A obtenido de *S. Typhimurium* cultivada en presencia (A) o ausencia (B) de oxígeno. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

### **3.2 Objetivo Específico 2.- Determinar la participación de ArcA y/o Fnr en la generación de modificaciones del lípido A en respuesta a la disponibilidad de oxígeno**

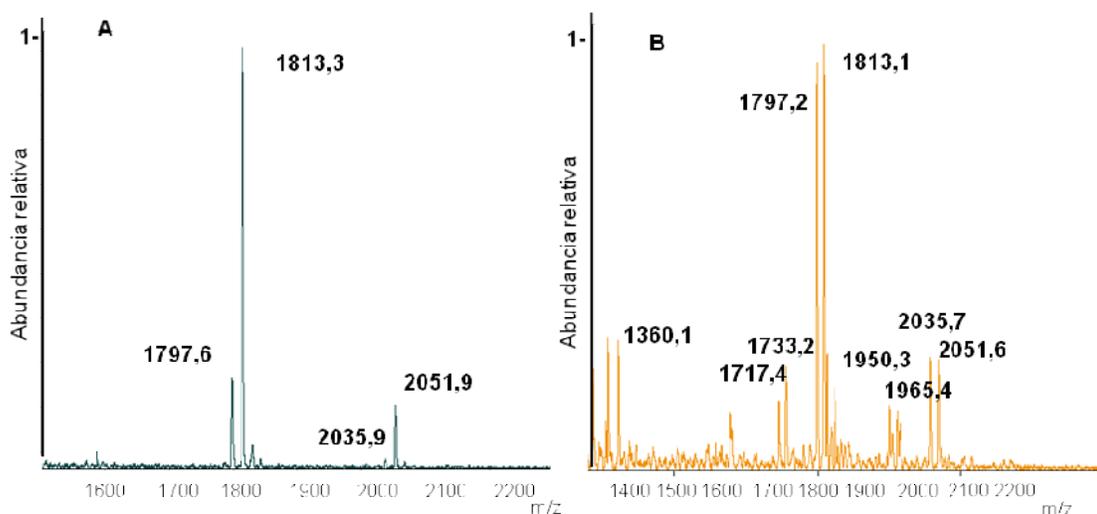
Numerosos genes son regulados directa o indirectamente por ArcA y Fnr en *Salmonella*, incluyendo genes relacionados con la virulencia. Para determinar la participación de estos reguladores en las modificaciones del lípido A dependientes de la disponibilidad de oxígeno descritas, se utilizaron mutantes  $\Delta arcA$  y  $\Delta fnr$  de *S. Enteritidis* NCTC13349 generadas en nuestro laboratorio (Tobar 2008).

Previo a la caracterización del lípido A de estas cepas, se evaluó su capacidad de crecer en medio mínimo en presencia o ausencia de oxígeno. La cepa  $\Delta fnr$  se desarrolló a niveles comparables con la cepa silvestre tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Sin embargo, aunque la cepa  $\Delta arcA$  creció a niveles comparables con la cepa silvestre en aerobiosis, presentó un escaso desarrollo cuando se cultivó en anaerobiosis (no mostrado). Lamentablemente, el escaso rendimiento de esta cepa impidió purificar suficiente lípido A bajo esta condición como para realizar análisis mediante espectrometría de masas. Por este motivo, en lugar de evaluar el efecto de la ausencia de ArcA se determinó el efecto de la sobreexpresión de este regulador en las modificaciones del lípido A. Para esto, se clonó el gen *arcA* de *S. Enteritidis* NCTC13349 con su promotor nativo en un plasmidio multicopia (*parcA*) y éste se transfirió a la cepa silvestre para estudiar su efecto sobre el lípido A.

A diferencia de la descripción anterior, donde se comparaba una misma cepa en condición aeróbica versus anaeróbica en medio mínimo E, a continuación se comparan los espectros de masas del lípido A obtenido de las distintas cepas (mutantes o transformadas) con el obtenido de la cepa silvestre de *S. Enteritidis* en la misma condición de crecimiento.

### 3.2.1 Participación de Fnr en las modificaciones del lípido A dependientes de la disponibilidad de oxígeno

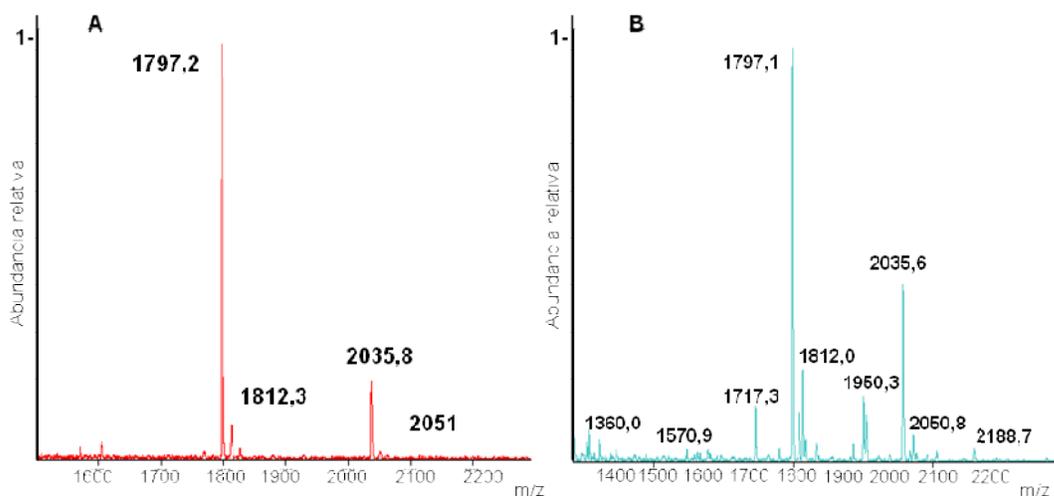
Inicialmente, se purificó el lípido A de la mutante  $\Delta fnr$  crecida aeróbicamente. En la **Figura 11A** se compara el espectro de masas de esta cepa con el de la cepa silvestre. Este último muestra las señales características descritas (ver descripción de la **Figura 9A**), con un predominio de especies hidroxiladas (**Figura 11A**). Por su parte, el espectro de la cepa  $\Delta fnr$  mostró algunas especies que no se detectan en la cepa silvestre bajo estas condiciones de cultivo (**Figura 11B**). Además de las especies hexa y heptaaciladas (señales a 1797,2 m/z y 2035,7 m/z, respectivamente) y sus contrapartes hidroxiladas (1813,1 m/z y 2051,6, respectivamente) presentes también en la cepa parental, en la mutante se identifican señales que corresponden a especies hexaaciladas que presentan sólo un grupo fosfato (1717,4 m/z) y a una especie de lípido A que no habíamos observado antes, correspondiente a moléculas hexaaciladas sustituida con fosfoetanolamina en uno de sus grupos fosforilos (1950,3 m/z). Entre 15 a 16 unidades de masa por sobre cada una de estas especies se observó la correspondiente especie hidroxilada (1733,2 m/z y 1965,4 m/z, respectivamente) (**Figura 11B**). A diferencia de la cepa silvestre, en que predominan las especies hidroxiladas en presencia de oxígeno, en la mutante  $\Delta fnr$  las especies no hidroxiladas e hidroxiladas presentan una abundancia relativa equivalente, sugiriendo una probable participación de Fnr en la regulación de esta modificación. Además, en esta cepa mutante fue posible detectar otra señal no observada anteriormente, correspondiente a lípido A tetraacilado sin modificaciones covalentes (1360,1 m/z).



(A) m/z observado S. Enteritidis	(B) m/z observado $\Delta fnr$	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
-	1360,1	1360	sin modificación (TET)	Zhuo <i>et al.</i> , 2010
-	1717,4	1716	HEX 1-P	Zhuo <i>et al.</i> , 2010
-	1733,2	-	(Posible) hidroxilación (HEX 1-P)	-
1797,6	1797,2	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,3	1813,1	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
-	1950,3	1949	HEX/fosfoetanolaminación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
-	1965,4	1966	HEX/hidroxilación/ Fosfoetanolaminación	-
2035,9	2035,7	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> 1997
2051,9	2051,6	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 11: Efecto de la delección de *fnr* sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en *S. Enteritidis* cultivada en presencia de oxígeno.** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de la cepa mutante  $\Delta fnr$  (B), cultivadas en condiciones aeróbicas. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

A continuación, el lípido A obtenido desde la cepa  $\Delta fnr$  cultivada anaeróbicamente se comparó con el obtenido desde la cepa silvestre cultivada en esta misma condición. Este último se muestra en la **Figura 12A**, observándose un predominio de las especies hexa y heptaciladas sin modificación (ver descripción de la **Figura 9B**).

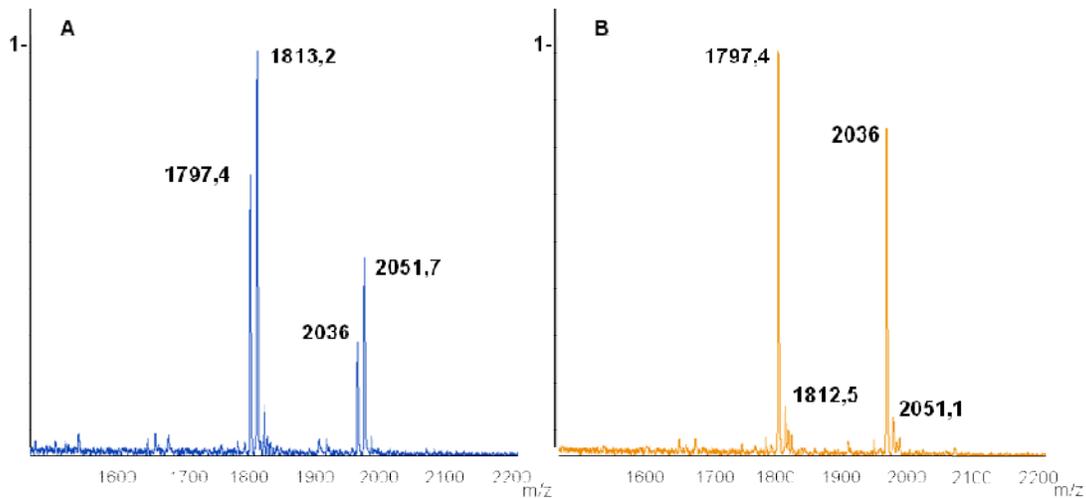


(A) m/z observado S. Enteritidis	(B) m/z observado $\Delta fnr$	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
-	1360,0	1360	sin modificación (TET)	Zhuo <i>et al.</i> , 2010
-	1570,9	1572	Sin modificación (PEN)	Kong <i>et al.</i> , 2012
-	1717,3	1716	HEX 1-P	Zhuo <i>et al.</i> , 1999
1797,2	1797,1	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1812,3	1812,0	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
-	1950,3	1949	HEX/fosfoetanolaminación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,8	2035,6	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> 1997
2051	2050,8	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
-	2188,7	2185	HEP/hidroxilación/ Aminoarabinosa	Guo <i>et al.</i> , 1997

**Figura 12: Efecto de la delección de  $fnr$  sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en *S. Enteritidis* cultivada en ausencia de oxígeno.** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de la cepa mutante  $\Delta fnr$  (B), cultivadas en condiciones anaeróbicas. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

Por su parte, en el lípido A de la cepa mutante se observaron las mismas especies cuando se creció en anaerobiosis: lípido A hexaacilado (1797,1 m/z), heptaacilado (2035,6 m/z), hexaacilado con sólo un grupo fosfato (1717,3 m/z) y hexaacilado sustituido con fosfoetanolamina (1950,3 m/z) (**Figura 12B**). En cada caso, se observó una menor proporción de las especies hidroxiladas, fenotipo característico de los cultivos anaeróbicos en la cepa silvestre.

En resumen, en la cepa  $\Delta fnr$  se observó la aparición de especies con distinto número de grupos acilos y modificaciones covalentes que no había sido posible detectar en la cepa silvestre, quizás por su baja abundancia o porque simplemente no se producen cuando Fnr es funcional. En relación con esto, cuando la cepa mutante se transformó con un plasmidio recombinante que tenía clonado el gen *fnr* de *S. Enteritidis* NCTC13349, se recuperó el espectro de la cepa silvestre, tanto en aerobiosis (**Figura 13A**) como en anaerobiosis (**Figura 13B**), lo que sustenta esta proposición.



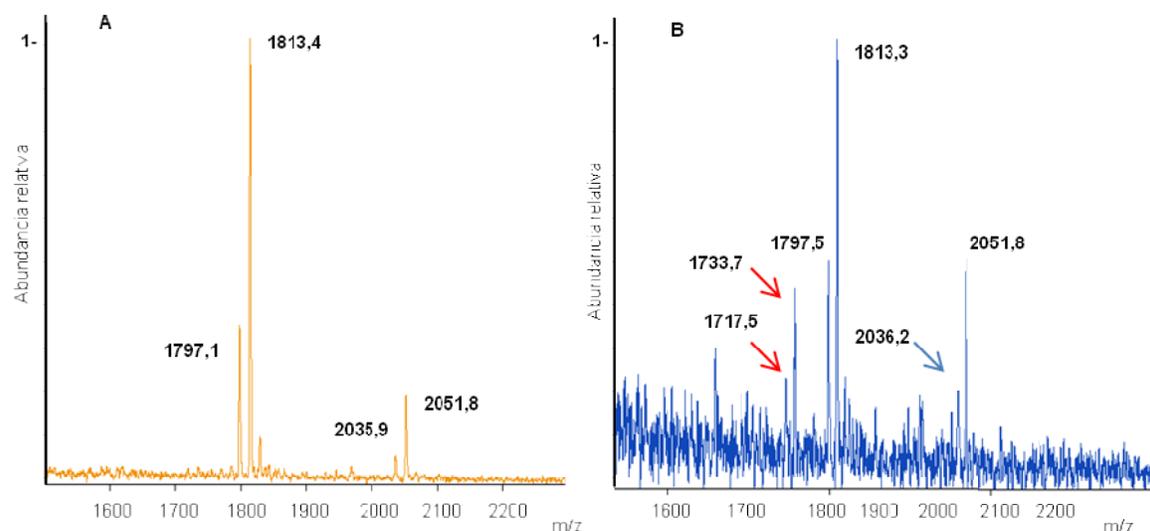
(A) m/z observado $\Delta fnpfnr+O_2$	(B) m/z observado $\Delta fnpfnr-O_2$	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1797,4	1797,4	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,2	1812,5	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2036	2036	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> /1997
2051,7	2051,1	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 13: Espectrometría de masas del lípido A de la cepa  $\Delta fnr$  complementada.** Se muestra el espectro de masas del lípido A, producto del efecto de la complementación de la cepa  $\Delta fnr$  con el plasmidio  $pfnr$  en presencia de oxígeno (A) y en ausencia (B) de oxígeno. En ambos casos se observan sólo cuatro especies mayoritarias, y los cambios en la abundancia de las especies producto de la variación de oxígeno. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

### 3.2.2 Participación de ArcA en las modificaciones del lípido A dependientes de la disponibilidad de oxígeno

Posteriormente, se estudió el posible papel de ArcA en las modificaciones del lípido A dependientes de oxígeno. En la **Figura 14A** se muestra el espectro de masas del lípido A de la cepa silvestre crecida aeróbicamente. Como se describió antes, en esta condición las especies hidroxiladas predominan sobre las no hidroxiladas, tanto en el lípido A hexaacilado como en el heptaacilado. Por su parte, el espectro del lípido A de la cepa  $\Delta arcA$  en presencia oxígeno en repetidas ocasiones presentó un elevado nivel de ruido en la línea base (**Figura 14B**), lo que hasta ahora no podemos explicar. No obstante, fue posible detectar las 4 especies descritas en la cepa silvestre: lípido A hexaacilado (1797,5 m/z), hexaacilado e hidroxilado (1813,3 m/z), heptaacilado (2035,7 m/z; apenas detectable por sobre el ruido) y heptaacilado e hidroxilado (2051,8 m/z) (**Figura 14B**). Al igual que en la cepa silvestre, en la mutante  $\Delta arcA$  predominan las especies hidroxiladas cuando se crece aeróbicamente. Interesantemente, en esta mutante también se detectó dos de las especies producidas por la mutante  $\Delta fnr$ : lípido A hexaacilado sustituido con sólo un grupo fosforilo (1717,5 m/z) y su variante hidroxilada (1733,7 m/z).

Debido a las dificultades que se presentaron al trabajar con la mutante  $\Delta arcA$  en anaerobiosis, para analizar el rol de ArcA en fenómeno de regulación transformamos la cepa silvestre con el plasmidio *parcA*, que permite sobreexpresar la proteína ArcA nativa. Se realizaron cultivos aeróbicos y anaeróbicos de la bacteria y se extrajo el lípido A para su análisis.

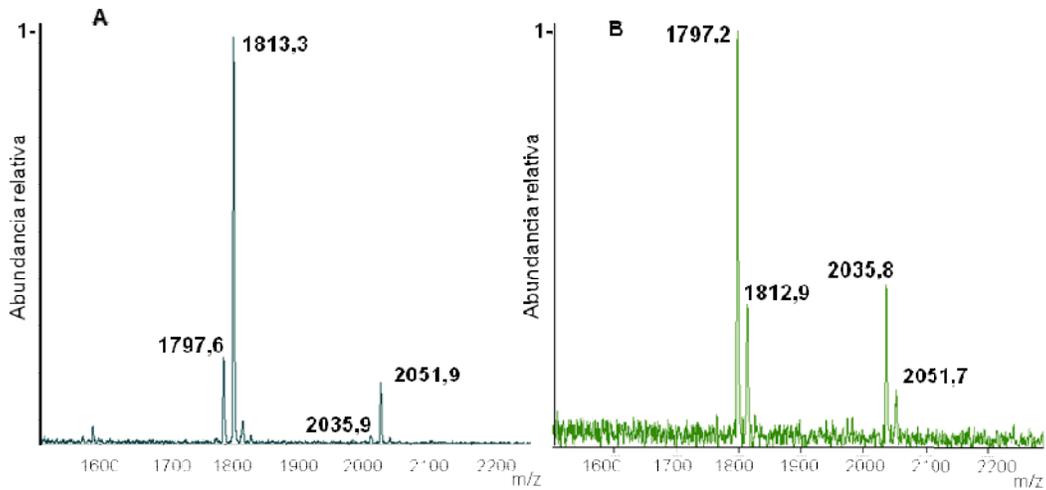


(A) m/z observado S. Enteritidis	(B) m/z observado $\Delta arcA$	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
-	1717,5	1716	HEX 1-P	Zhuo <i>et al.</i> , 2010
-	1733,8	-	(Posible) hidroxilación (HEX 1-P)	-
1797,1	1797,5	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,4	1813,3	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,9	2036,2	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007/Guo <i>et al</i> 1997
2051,8	2051,8	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 14: Efecto de la delección de *arcA* sobre la diversidad y abundancia de especies de lípido A en *S. Enteritidis* cultivada en presencia de oxígeno.** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de la cepa mutante  $\Delta arcA$  (B), cultivadas en condiciones aeróbicas. Se muestran señales adicionales indicadas con flechas rojas. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

En la **Figura 15A** se muestra el espectro de masa característico del lípido A de la cepa silvestre crecida en anaerobiosis, con sus respectivas señales. En el espectro del lípido A de *S. Enteritidis/parcA* crecido en anaerobiosis (**Figura 15B**) también se observan las cuatro señales características que corresponden a lípido A hexaacilado (1797,2 m/z), hexaacilado e hidroxilado (1812,9 m/z), heptaacilado (2035,8 m/z) y heptaacilado e hidroxilado (2051,7 m/z) (**Figura 15B**). Sin embargo, es importante destacar que al sobreproducir ArcA las abundancias relativas de las especies hidroxiladas y no hidroxiladas se invierten con respecto a lo que se observa en el caso de la cepa silvestre, tanto para las especies hexaaciladas como para las heptaaciladas. Notablemente, existe un predominio de las moléculas de lípido A que no ha sufrido modificaciones. En otras palabras, la distribución de especies que muestra el lípido A al sobreexpresar *arcA*, aun habiendo oxígeno suficiente durante el cultivo, se asemeja al lípido A obtenido a partir de cultivos anaeróbicos, donde las hidroxilaciones son las especies menos abundantes (comparar **Figura 15B** con **Figura 11A**). Este resultado es interesante, porque hasta ahora el oxígeno sólo se conocía como uno de los sustratos de la reacción catalizada por LpxO. Sin embargo, aun en presencia de oxígeno la hidroxilación no se produjo al sobreexpresar *arcA*, lo que podría explicarse por un efecto inhibitorio de este regulador sobre la actividad LpxO o en su nivel de expresión genética.

Por otra parte, se analizó la cepa transformada con *parcA* en condición anaeróbica y se comparó con la cepa silvestre. El espectro de la cepa silvestre mostró el fenómeno antes descrito: menor abundancia especies hidroxiladas del lípido A, siendo detectables sólo dos señales correspondientes a especies hexaaciladas y heptaacilado sin modificación (1797,2 m/z y 2035,8 m/z, respectivamente) (**Figura 16A**). Por último, el espectro de la cepa transformada con *parcA* se observó una mayor abundancia de la especie heptaacilada en comparación con la cepa silvestre (**Figura 16B**). La síntesis de esta especie depende de PagP, sugiriendo que ArcA podría regular la expresión del gen que codifica esta enzima.

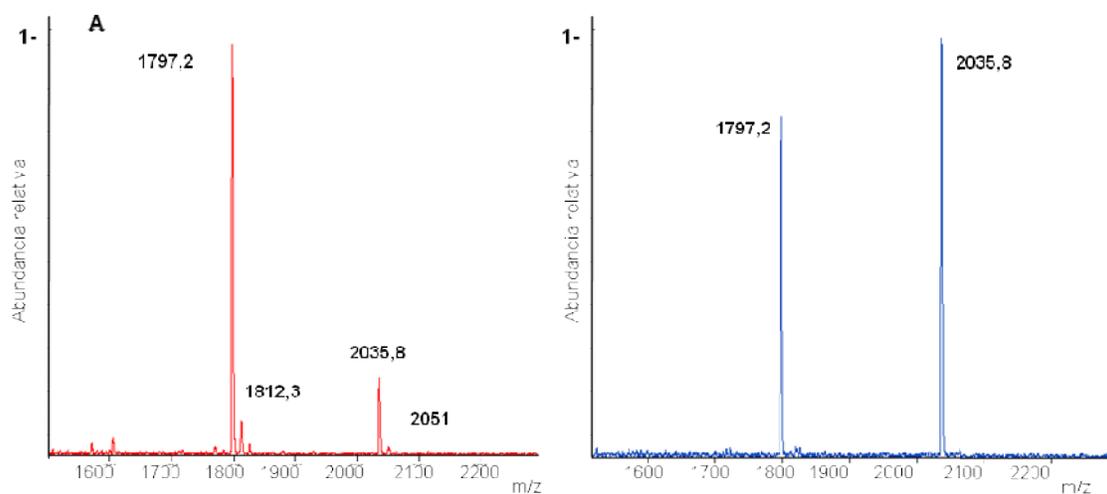


(A) m/z observado <i>S. Enteritidis</i>	(B) m/z observado <i>parcA</i>	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1797,6	1797,2	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1813,3	1812,9	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,9	2035,8	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> 1997
2051,9	2051,7	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 15: Efecto de la sobreexpresión de *arcA* sobre y abundancia de especies de lípido A en *S. Enteritidis* cultivada en presencia de oxígeno.** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de la cepa transformada con el plasmidio *parcA* (B), cultivadas en condiciones aeróbicas. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

### 3.3 Objetivo Específico 3.- Determinar el rol de ArcA y Fnr en la regulación de la expresión génica de las enzimas responsables de las modificaciones del Lípido A

Como hemos visto en este trabajo, al crecer *S. Enteritidis* en aerobiosis existe una mayor abundancia relativa de especies hidroxiladas del lípido A respecto a las sin modificación. En anaerobiosis ocurre lo contrario, habiendo una mayor abundancia relativa de las especies sin modificación. También determinamos que en las cepas  $\Delta fnr$  y *parcA*, ocurren cambios en la diversidad de especies de lípido A y en la abundancia relativa de especies hidroxiladas. Por otro lado, la abundancia de



(A) m/z observado S. Enteritidis	(B) m/z observado <i>parcA</i>	m/z referencia	modificación en lípido A	bibliografía
1797,2	1797,2	1798	sin modificación (HEX)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
1812,3	-	1814	HEX/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007
2035,8	2035,8	2036	acilación (HEP)	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007 /Guo <i>et al</i> 1997
2051	-	2052	HEP/hidroxilación	Kawasaki <i>et al.</i> , 2007

**Figura 16: Efecto de la sobreexpresión de *arcA* sobre la abundancia de especies de lípido A en *S. Enteritidis* cultivada en ausencia de oxígeno.** Se muestra los espectros de masa del lípido A obtenido de *S. Enteritidis* silvestre (A) y de la cepa transformada con el plasmidio *parcA* (B), cultivadas en condiciones anaeróbicas. La tabla adjunta asocia la masa de cada señal con una especie de lípido A descrita por otros autores. Los espectros fueron adquiridos por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo ion negativo.

lípido A heptaacilado cambió al sobreexpresar *arca*. Esto indica que el lípido A se modifica en respuesta a la disponibilidad de oxígeno y en este proceso participan los reguladores globales de respuesta Fnr y ArcA, los que podrían estar regulando la expresión de las enzimas responsables de estos cambios, como LpxO y PagP. Para confirmar esta idea, se determinó el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el nivel de transcrito de los genes *lpxO* y *pagP* en la cepa silvestre y sus derivadas  $\Delta$ *fnr* y *parcA* mediante qRT-PCR.

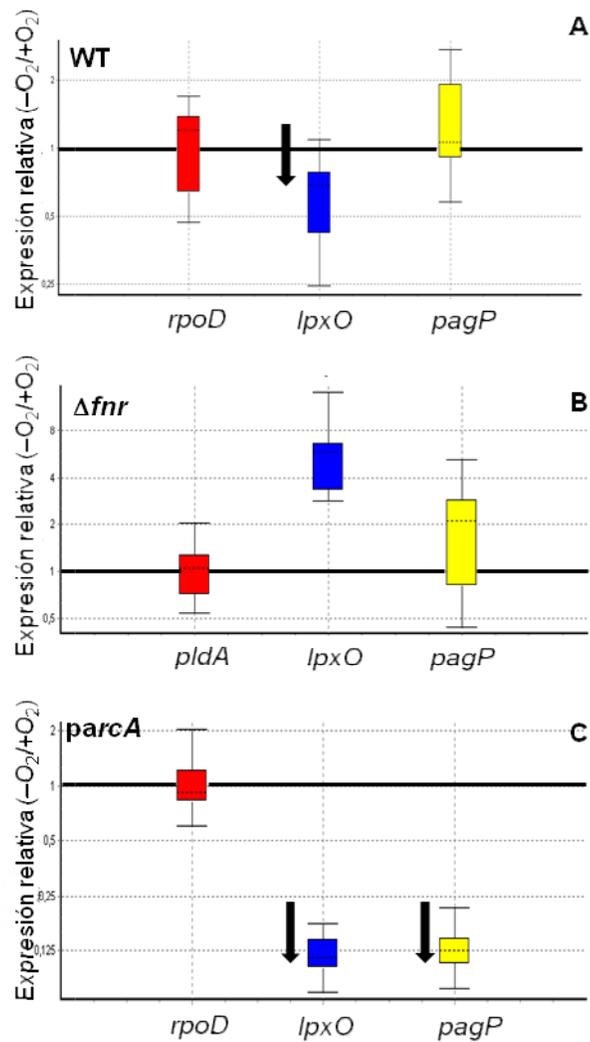
En primer lugar, se determinó el efecto de la ausencia de oxígeno sobre la expresión de los genes en la cepa silvestre (Figura 17A). Para el análisis de los datos se utilizó como referencia el gen *housekeeping rpoD*, que codifica el factor sigma 70, cuyo nivel de transcrito se mantiene constante en anaerobiosis y

aerobiosis. Consecuentemente, la razón de expresión relativa (anaeróbico/aeróbico) para *rpoD* fue 1. En el caso del gen *lpxO* se determinó una expresión relativa de 0,604 ( $p < 0,034$ ), lo que indica una disminución en el número de transcritos de *lpxO* cuando la bacteria crece anaeróticamente versus aeróticamente (**Figura 17A**). Esto sugiere que la expresión de *lpxO* es regulada por la disponibilidad de oxígeno en el medio. Además, este resultado concuerda con la regulación de la hidroxilación del lípido A dependiente de oxígeno (ver **Figura 9**). Por su parte, en la cepa silvestre no se registró una diferencia significativa en los niveles de transcrito del gen *pagP* cuando la bacteria crece en anaerobiosis versus aerobiosis, como también se observa en la cepa silvestre (**Figura 17A**).

Una vez registrado los cambios que se producen en los genes de interés en la cepa silvestre, se determinó qué ocurre en las cepas  $\Delta fnr$  y *parcA*. En el caso de la mutante  $\Delta fnr$  se utilizó como referencia el gen *housekeeping pldA*. Este gen codifica una fosfolipasa localizada en la membrana plasmática de *Salmonella*. Se cambió el gen de referencia a *pldA*, ya que *rpoD* presentó importantes variaciones en sus niveles de expresión en ausencia del regulador Fnr. A diferencia de lo observado en la cepa silvestre, en la mutante  $\Delta fnr$  se observó un aumento en el nivel de transcritos de *lpxO* en condiciones anaeróbicas versus aeróbicas (expresión relativa = 2,324). Los resultados anteriores indican desregulación de la expresión dependiente de oxígeno de *lpxO*. Por su parte, en el caso del gen *pagP* nuevamente no se detectaron diferencias en los niveles de transcrito del gen *pagP* cuando la bacteria crece en anaerobiosis versus aerobiosis, al igual que lo observado en la cepa silvestre (**Figura 17B**).

Para dilucidar la participación de ArcA en la regulación de la expresión del gen *lpxO*, se utilizó la cepa que sobreexpresa este regulador a partir del plasmidio *parcA*. El análisis de *lpxO* mostró una expresión relativa (anaerobiosis/aerobiosis) de 0,119 ( $p < 0,013$ ), que es menor a la observada en el caso de la cepa silvestre (**Figura 17C**). Esto resultó inesperado, ya que la sobreexpresión de *arcA* sugiere

dos escenarios: que ArcA podría aumentar el nivel de transcrito de *lpxO* en aerobiosis o disminuir de manera significativa en anaerobiosis. Sin embargo, esta idea no se correlaciona con la composición estructural del lípido A, donde al sobreexpresar *arcA* disminuye la hidroxilación en aerobiosis, lo que sugiere que ArcA sería un regulador negativo para la expresión de *lpxO* en esta condición (**Figura 14B**). Por último, la expresión relativa anaerobiosis/aerobiosis de *pagP* en este experimento tuvo un valor de 0,123 ( $p < 0,0118$ ), que es menor al observado en la cepa silvestre. Si bien este resultado es interesante, no concuerda con el cambio observado en la abundancia relativa de las especies heptaaciladas al sobreexpresar ArcA en *S. Enteritidis* durante el crecimiento anaeróbico (**Figura 15B**).



**Figura 17: Efecto del oxígeno y de los reguladores transcripcionales Fnr y ArcA sobre la expresión relativa de los genes *lpxO* y *pagP*.** Se determinó el nivel relativo (anaerobiosis/aerobiosis) de los transcritos de los genes *lpxO* y *pagP* en *S. Enteritidis silvestre* (A) y en sus derivadas isogénicas  $\Delta fnr$  (B) y *parcA* (C). Se muestran los datos para los genes *housekeeping* usados como referencia. Las flechas señalan los cambios significativos en la expresión relativa (anaerobiosis/aerobiosis) respecto a los genes *housekeeping* en cada cepa. Los niveles de transcrito se terminaron mediante qRT-PCR.

## 4 Discusión

*Salmonella* se ve enfrentada a diversas condiciones ambientales durante su ciclo infectivo, siendo la baja disponibilidad de oxígeno existente en el intestino y la sangre del hospedero una de las más relevantes por su importancia en la virulencia bacteriana. En esta línea, estudios previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que la condición de anaerobiosis afecta la distribución de largos de cadena del AgO que compone la estructura del LPS en *S. Enteritidis*. Además, nuestros resultados indican que en este fenómeno intervienen los factores transcripcionales Fnr y ArcA (Silva *et al.*, 2016), reguladores maestros de la adaptación fisiológica a la anaerobiosis en *Salmonella* (Evans *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue determinar la estructura que presenta el lípido A de *S. Enteritidis* al crecer en un medio de cultivo definido y si esta estructura varía dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio. Junto a lo anterior, se pretendía determinar la participación de Fnr y/o ArcA en este proceso y si algunas enzimas responsables de estos eventuales cambios estructurales estaban bajo el control de estos factores transcripcionales. Se utilizó como principal herramienta la espectrometría de masas MALDI-TOF para identificar las especies de lípido A y sus posibles modificaciones. Para esto, se optimizó un método de purificación de lípido A basado en los trabajos de distintos autores (Yi y Hacckett, 2000; Tirsoaga *et al.*, 2007; Caroff y Novikov., 2011), el que se implementó sistemáticamente en nuestro laboratorio.

A nuestro entender, la estructura del lípido A de *S. Enteritidis* no se ha descrito en la literatura. Por este motivo, dadas las similitudes genéticas y las similitudes entre los mecanismos moleculares de patogenicidad y de respuesta al sistema inmune del hospedero entre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, los resultados obtenidos en este trabajo se compararán con los descritos para este último serovar.

En este trabajo, bajo nuestras condiciones de crecimiento, independiente de la disponibilidad de oxígeno, se detectaron 4 especies mayoritarias de lípido A en *S. Enteritidis*, correspondientes a especies hexa y heptaaciladas, con o sin la hidroxilación de un acilo en la cadena lateral 3'. Una distribución de especies muy

similar se encontró en *S. Typhimurium*. El principal efecto que tuvo la disponibilidad oxígeno sobre el lípido A de *S. Enteritidis* (y también de *S. Typhimurium*) fue sobre la adición de este sustituyente (especies hidroxiladas de lípido A). Así, en presencia de oxígeno la población preponderante de lípido A es la que corresponde a moléculas hexa o heptaaciladas que contenían hidroxilaciones. En contraste, al crecer las bacterias en condiciones anaeróbicas se producen en una mucho menor cantidad (o son indetectables) las especies hidroxiladas, siendo las moléculas hexa o heptaaciladas sin modificaciones las especies mayoritarias. Guo *et al.* (1997), utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, describieron la estructura del lípido A de *S. Typhimurium* crecida en medio rico (LB) en presencia de oxígeno. En ese estudio, las señales detectadas mayoritariamente corresponden a especies no hidroxiladas, a pesar de la presencia de oxígeno durante el cultivo, lo que difiere del perfil de especies encontrado en nuestro trabajo tanto en *S. Enteritidis* como *S. Typhimurium*. No obstante, en una mutante de *S. Typhimurium* que expresa una variante constitutivamente activa de proteína PhoP (PhoP<sup>C</sup>) se detectó las especies hidroxiladas, además de otras modificaciones covalentes conocidas por ser controladas por este regulador global (Guo *et al.*, 1997). Los datos de esta Memoria indican, sin embargo, que es poco probable que bajo nuestras condiciones experimentales (cultivos en medio a pH neutro y en presencia de ~1 mM Mg<sup>2+</sup>) se esté activando el sistema PhoP/PhoQ, lo que es apoyado por el hecho de no haber detectado otras modificaciones del lípido A dependientes de este sistema, como la adición de aminoarabinosa y fosfoetanolamina. Por otro lado, un espectro de masas similar al obtenido cuando cultivamos *S. Enteritidis* en presencia de oxígeno fue obtenido por Kawasaki *et al.* (2007), pero en su estudio usó una cepa mutante *pmrA::Tn10d ΔpagL* de *S. Typhimurium* crecida en medio mínimo N a pH 5,8. Si bien estas condiciones experimentales son distintas a las empleadas en nuestro estudio, el hecho de detectar especies de lípido A comunes, sugiere que el regulador transcripcional PmrA podría ser parte de la regulación por oxígeno descrita en este trabajo.

Respecto a la regulación por oxígeno, Gibbons *et al.* (2000) habían descrito un fenómeno similar para una cepa PhoP<sup>C</sup> de *S. Typhimurium* crecida en medio rico (LB), en la que disminuían las hidroxilaciones de lípido A en ausencia de oxígeno. Sin embargo, en ese estudio las especies no hidroxiladas siempre fueron las prevalentes, independiente de la condición de crecimiento (Gibbons *et al.*, 2000). Esto contrasta con los datos obtenidos en este trabajo, que mostraron que son más abundantes las especies hidroxiladas durante el crecimiento aeróbico y las no hidroxiladas durante el cultivo anaeróbico.

La regulación dependiente de oxígeno de la estructura del lípido A de *S. Enteritidis* sugiere la participación de los reguladores globales Fnr y ArcA. Al crecer la cepa  $\Delta fnr$  en presencia de oxígeno se observó una población más heterogénea de lípido A, en la que domina en abundancia la especie canónica y su contraparte hidroxilada, ambas presentes en igual proporción. Esto indica una desregulación en el nivel de hidroxilación del lípido A, ya que bajo estas condiciones en la cepa silvestre la especie hidroxilada es mucho más abundante que la no hidroxilada bajo. Además, en este caso se pudo reconocer otras especies, tales como lípido A hexaacilado monofosforilado y lípido A hexaacilado y modificado con un grupo fosfoetanolamina, junto con su correspondiente contraparte hidroxilada presente en igual proporción que la no hidroxilada. En ausencia de oxígeno también se observó esta heterogeneidad estructural, pero en este caso el nivel de las especies hidroxiladas fue menor, similar a lo que ocurre en la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados indican el regulador global de respuesta Fnr participa en el control del nivel de hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis*.

Por otra parte, la adición de un grupo fosfoetanolamina o la presencia de sólo un fosfato en la molécula canónica nos sugieren que Fnr cumple un papel en la regulación del proceso de generación de estas especies. Se conoce que la incorporación de fosfoetanolamina, modificación que protege a la bacteria frente a la acción de CAMP como la polimixina B, depende de la activación de los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB (Zhou *et al.*, 2001; Wang y Quinn 2010). Como se mencionó, bajo nuestras condiciones experimentales estos

sistemas estarían inactivos. Esto sugiere un rol directo, no descrito, de Fnr sobre la expresión y/o actividad de las enzimas responsables de las modificaciones. Alternativamente, Fnr actuaría sobre uno o ambos sistemas de dos componentes. Se requerirían experimentos adicionales para dilucidar el mecanismo subyacente a este hallazgo, como por ejemplo realizar análisis de la estructura del lípido A obtenido desde cepas en las que estos sistemas estén inactivos. Por otra parte, Fink *et al.* (2007) describieron que la delección de *fnr* en *S. Typhimurium* genera un fenotipo atenuado en el modelo murino de infección. Es posible entonces que ese fenotipo resulte en parte de la alteración en el nivel de modificaciones covalentes que ocurren en la mutante, lo que afectaría el *fitness* de esta cepa durante la infección.

Cabe hacer notar que la mayor heterogeneidad de especies de lípido A en la cepa mutante  $\Delta fnr$  respecto a la silvestre se observó tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Esto es interesante porque se ha descrito que Fnr es completamente inactivo cuando el oxígeno está presente en el medio (Green *et al.*, 2009). En consecuencia, los resultados de este trabajo ponen en entredicho tal afirmación, ya que no debería observarse fenotipo alguno en la cepa mutante al cultivarla en presencia de oxígeno. Esto respalda resultados anteriores de nuestro laboratorio que también muestran un fenotipo en la distribución de largos de cadena del AgO de esta cepa en presencia de oxígeno (Silva *et al.*, 2016).

Al igual que nuestros datos con *S. Enteritidis*, los resultados de Gibbons *et al.* (2000) en el serovar *Typhimurium*, muestran que la hidroxilación del lípido A depende de oxígeno. Esta modificación es catalizada por LpxO, una dioxigenasa localizada en la membrana plasmática (Gibbons *et al.*, 2000). Según los autores, la hidroxilación del miristato lateral depende de oxígeno, porque éste es uno de los sustratos utilizados por la enzima (Gibbons *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2005). En esta Memoria, sin embargo, al trabajar con la cepa que sobreexpresa *arcA* observamos que aun en presencia de oxígeno el nivel de hidroxilación del lípido A disminuyó drásticamente, siendo similar al de la cepa silvestre en ausencia de oxígeno. Como se discutió, en la cepa  $\Delta fnr$  también se observó una desregulación

en el nivel de hidroxilación del lípido A en presencia de oxígeno. Por lo tanto, la hidroxilación del lípido A sería regulada por estos factores transcripcionales, los que dependen directa o indirectamente de oxígeno. Esta indica que el oxígeno no actuaría sólo como un sustrato de LpxO en este proceso. Esta hipótesis es consistente con estudios bioinformáticos realizados en nuestro laboratorio, que indican la presencia de cajas de unión para Fnr y/o ArcA en las regiones promotoras del gen *lpxO*. Además, experimentos de cambios en la movilidad electroforética (EMSA) realizados también en nuestro laboratorio indican que Fnr y ArcA se unen a los promotores de este gen (resultados no publicados). Por su parte, en la cepa silvestre el nivel relativo (anaeróbico/aeróbico) del transcrito de *lpxO* disminuyó, lo que es consistente con una regulación de la hidroxilación del lípido A dependiente de la disponibilidad de oxígeno. Además, esta regulación se perdió en la mutante  $\Delta fnr$  y en la cepa que sobreexpresa *arcA*, confirmando la participación de estos reguladores en el proceso.

Poco se sabe sobre el rol biológico de LpxO y de la hidroxilación de la cadena lateral de miristato (2-hidroximiristato) en el lípido A de *Salmonella*. De hecho, a pesar de estar muy estudiada aun no se le puede asignar el aporte que le confiere esta enzima a la bacteria (Maeshima *et al.*, 2013). Se cree que el 2-hidroximiristato que eventualmente se libera, podría tener un rol en la regulación de las acilaciones de distintas proteínas de la célula eucarionte, al interferir con la actividad de una miristoil transferasa del hospedero que utilizaría el grupo miristato para modificar proteínas de membrana (Gibbons *et al.*, 2000). En *Salmonella Typhimurium* otros autores muestran que las hidroxilaciones del lípido A permitirían a la bacteria a invadir mejor células epiteliales (Moreira *et al.*, 2013).

Finalmente, los resultados de esta Memoria sugieren que la dinámica estructural del lípido A en respuesta a la variación en la disponibilidad de oxígeno que experimenta *Salmonella* durante la infección, podría ser parte de la adaptación al ambiente y, eventualmente, de la patogenia de esta bacteria.

## 5 Conclusiones

Se adaptó un método para la extracción de lípido A desde distintos representantes de *Salmonella enterica*, que permite el estudio de la estructura de esta molécula compleja mediante espectrometría de masas. De este modo, se logró dilucidar la distribución y abundancia de especies del lípido A de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

La disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo controla el nivel de hidroxilación del lípido A de *S. Enteritidis*, predominando las especies hidroxiladas en aerobiosis y las especies no hidroxiladas en anaerobiosis. En *S. Typhimurium* ocurre un fenómeno similar.

Los reguladores globales de respuesta a la anaerobiosis Fnr y ArcA participan en la modulación de la composición estructural y abundancia relativa de las especies del lípido A de *S. Enteritidis* dependiente de la disponibilidad de oxígeno.

Los reguladores ArcA y Fnr de *S. Enteritidis* están involucrados en la regulación de la expresión del gen *lpxO* en respuesta a la disponibilidad de oxígeno. Esto indica que el oxígeno, además de ser sustrato de LpxO, sirve de señal regulatoria para el control del nivel de hidroxilación del lípido A.

## 6 Referencias

- Ahn VE, Lo EI, Engel CK, Chen L, Hwang PM, Kay LE, Bishop RE, Privé GG. (2004).** A hydrocarbon ruler measures palmitate in the enzymatic acylation of endotoxin. *EMBO J.* 23(15):2931-2941.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. (2000).** *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38(7):2465-2467.
- Caroff M, Novikov A. (2011).** Micromethods for lipid A isolation and structural characterization. En: Holst (eds.) *Microbial toxins: Methods and protocols, methods in molecular biology*, vol. 739, Springer Science+Business, New York pp 135-146.
- Datsenko KA, Wanner BL. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(12):6640-6645.
- Delgado MA, Mouslim C, Groisman EA. (2006).** The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol. Microbiol.* 60:39-50.
- Erwin AL, Munford RS. (1990).** Deacylation of structurally acyloxyacyl hydrolase. *J. Biol. Chem.* 265:16444-16449.
- Evans MR, Fink RC, Vazquez-Torres A, Porwollik S, Jones-Carson J, McClelland M, Hassan HM. (2011).** Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiol.* 11:58.
- Fica A, Fernandez A, Prat S, Figueroa O, Gamboa R, Tsunekawa I, Heitmann I. (1997).** *Salmonella* Enteritidis, an emergent pathogen in Chile. *Rev. Med. Chil.* 125:544-551.
- Galán JE. (1996).** Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 209:43-60.
- García Véscovi E, Soncini FC, Groisman EA. (1996).** Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* 84(1):165-174.

**Gibbons HS, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR. (2005).** Role of Mg<sup>2+</sup> and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. Mol. Microbiol. 55:425-440.

**Gibbons HS, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. (2000).** Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella* Typhimurium lipid A. Function of LpxO, A new Fe<sup>2+</sup>/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. J. Biol. Chem. 275(42):32940-32949.

**Groisman EA (1998).** The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup> as a regulatory signal. Bioessays. 20(1):96-101.

**Groisman EA, Chiao E, Lipps CJ, Heffron F. (1989).** *Salmonella* Typhimurium *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(18):7077-7081.

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

**Gunn JS, Ernst RK, McCoy AJ, Miller SI. (2000).** Constitutive mutations of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator *phoP*. Infect. Immun. 68(6):3758-3762.

**Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI. (1997).** Regulation of lipid A modifications by *Salmonella* Typhimurium virulence genes *phoP-phoQ*. Science 276(5310):250-253.

**He G, Shankar RA, Chzhan M, Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. (1999).** Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4586-4591.

**Hold GL y Bryant CE. (2011).** The molecular basis of lipid A and Toll-like receptor 4 interactions. En: Knirel y Valvano (eds.) Bacterial lipopolysaccharides. Springer-Verlag/Wien, New York, p. 372.

**Jennewein J, Matuszak J, Walter S, Felmy B, Gendera K, Schatz V, Nowotny M, Liebsch G, Hensel M, Hardt WD, Gerlach RG, Jantsch J. (2015).** Low-oxygen tensions found in *Salmonella*-infected gut tissue boost *Salmonella* replication in macrophages by impairing antimicrobial activity and augmenting *Salmonella* virulence. *Cell Microbiol.* 17(12):1833-1847.

**Jeon Y, Lee YS, Han JS, Kim JB, Hwang DS. (2001).** Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* 276(44):40873-40879.

**Kawasaki K, China K, Nishijima M. (2007).** Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 189(13):4911-4919.

**Kawasaki K, Teramoto M, Tatsui R, Amamoto S. (2012).** Lipid A 3'-O-deacylation by *Salmonella* outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428(3):343-347.

**Kiley JP, Beinert H. (1998).** Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(5):341-352.

**Kong Q, Six D, Liu Q, Gu L, Wang S, Alamuri P, Raetz CR, Curtiss R. (2012).** Phosphate groups of lipid A are essential for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity *Infect. Immun.* 80(9):3215-3224.

**Lee CA, Falkow S. (1990).** The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(11):4304-4308.

**Maeshima N, Fernandez RC. (2013).** Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:3:3.

**Marolda CL, Lahiry P, Vines E, Saldias S, Valvano MA. (2006).** Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol. Biol.* 347:237-252.

**Murray G L, Attridge SR, Morona R. (2005).** Inducible serum resistance in *Salmonella* Typhimurium is dependent on *wzz*(*fepE*)-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect.* 7:1296-1304.

**Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA. (2003).** Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J. Immunol.* 170(10):5203-509.

**Prado V, Solari V, Alvarez IM, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O'Ryan M, Munoz V. (2002).** Epidemiological situation of foodborne diseases in Santiago, Chile in 1999-2000. *Rev. Med. Chil.* 130:495-501.

**Raetz CR y Whitfield C. (2002).** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71:635-700.

**Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright, SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. (1991).** Gramnegative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb. J.* 5:2652-6260.

**Raetz CR. (1990).** Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:129-170.

**Raetz CR. (1993).** Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eukaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* 175:5745-5753.

**Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel C, Akçelik M, Bäumler AJ. (2006).** Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect. Immun.* 74(1):19-27.

**Ravcheev DA, Gerasimova AV, Mironov AA, Gelfand MS. (2007).** Comparative genomic analysis of regulation of anaerobic respiration in ten genomes from three families of gammaproteobacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*). *BMC Genomics* 8:54.

**Reeves, P. (1993).** Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. Trends Genet. 9:17-22.

**Rhen M, Dorman CJ. (2005).** Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieu. Int. J. Med. Microbiol. 294(8):487-502.

**Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. (1994).** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 8:217-225.

**Roberts JA, Sockett PN. (1994).** The socio-economic impact of human *Salmonella* Enteritidis infection. Int. J. Food Microbiol. 21:117-129.

**Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB. (2000).** *Salmonella* Typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. J. Immunol. 164(11):5894-5904.

**Rychlik I, Barrow PA. (2005).** *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiol. Rev. 29:1021-1040.

**Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. (2001).** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect. 3:1335-1344.

**Sawers G. (1999).** The aerobic/anaerobic interface. Curr. Opin. Microbiol. 2:181-187.

**Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. (2005).** Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*. Metab. Eng. 7(5-6):364-374.

**Silipo A, Molinaro A. (2011).** Lipid A structure. En: Knirel y Valvano (eds.) Bacterial lipopolysaccharides. Springer-Verlag/Wien, New York, p.3.

**Silva CA, Velásquez F, Peñailillo J, Garcias H, Tobar P, Contreras I, Santiviago C, Álvarez S. (2016).** Fnr and ArcA control expression of O-antigen

biosynthesis genes and chain-length regulators WZZ<sub>SE</sub> and WZZ<sub>fepE</sub> in response to oxygen availability in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis **(EN PREPARACIÓN)**

**Tirsoaga A, El Hamidi A, Perry MB, Caroff M, Novikov A. (2007).** A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. J. lip. res. 48:2419-2427

**Tobar P. (2008).** Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el grado de polimerización del antígeno O de *Salmonella* Typhi, Typhimurium y Enteritidis. Participación de los reguladores transcripcionales Fnr y ArcA. Memoria para optar al título de bioquímico presentada a la Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile.

**Verma N, Reeves P. (1989).** Identification and sequence of *rfaS* and *rfaE*, which determine antigenic specificity of group A and group D salmonellae. J. Bacteriol. 171(10):5694-5701.

**Wang X, Quinn P. (2010).** Lipopolisaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. Prog. lip. res. 49:97-107.

**Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR. (2001).** Lipid A modifications in polymixin-resistant *Salmonella* Typhimurium: PmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-1-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. J. Biol. Chem. 2001, 276:43111-43121.