

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Análisis comparativo de los genes involucrados en la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum*”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Clínica, y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

ANDREA VERÓNICA SABAG MATILLA

Directores de Tesis

Dr. Carlos Alberto Santiviago Cid

Dr. Sergio Aníbal Álvarez Armijo

SANTIAGO - CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

ANDREA VERÓNICA SABAG MATILLA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Clínica y al título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

_____.

Directores de Tesis:

Dr. Carlos A. Santiviago

Dr. Sergio A. Álvarez

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Davor Cotorás (Presidente)

Dr. Javier Puente

Dra. Denisse Bravo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han acompañado en esta etapa aportando en mi desarrollo profesional y personal.

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres, Ariel y Ana, por ser las mejores personas que conozco. Agradezco enormemente cada esfuerzo que realizaron para que yo creciera en todos los ámbitos, entregándome la libertad de decidir por mis intereses. Gracias por cada consejo, reflexión, reto, alegría y regaloneo que me han brindado. Los amo. A Kyria por hacer más alegre cada llegada a casa y a mi madrina, abuela, tíos y primos por la preocupación y cariño.

Quisiera agradecer a Felipe por estar siempre a mi lado, por ser mi compañero de vida y por ser el hombre con la paciencia más grande del mundo. Gracias por compartir mis alegrías y fracasos y aguantar mis frustraciones y mañas. Todo es mejor con tu apoyo y cariño.

Agradezco profundamente a mis tutores de tesis, Cliff y Sergio, por su apoyo y preocupación en cada etapa de este proceso. Gracias por darme la oportunidad de enamorarme de la microbiología, por aportar en mi crecimiento profesional y por la confianza entregada en cada ayudantía. Además, agradezco a la Dra. Daniela Seelenfreund por su apoyo y paciencia. A la Dra. France Daigle, por ayudarme en mi estadía en Montreal y a Eve-lyne, Julie, Claudie, Karine y Sam por las risas y paseos.

Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio, en especial a Kamo, por su cariño, apoyo incondicional y por enseñarme todo lo que aprendí en el laboratorio; a Pali, por tener siempre la razón y ser una excelente compañera de viaje; Fernando, por tener la mejor disposición para ayudar; Bayron, por sus historias que siempre sacan risas; Jimmy y Héctor, por ser mis partners del chancheo; Ítalo, por su ayuda y consejos y a Bea y Morgan por el apoyo y alegrías compartidas. Gracias por hacer del laboratorio un lugar grato lleno de risas y momentos inolvidables y por potenciar el desarrollo de mis tacles deslizantes. Agradezco también a ex miembros del laboratorio: Pipe, Paula, Raet, David, Chechi y Roberto por los gratos momentos compartidos.

Agradezco enormemente a mis amigos que me han acompañado en todo este proceso y más. Agradezco a Jenny por su hermosa y sincera amistad que sigue creciendo desde el liceo. Gracias por estar siempre en los momentos más importantes. A mis grandes amigos del team calipso: Nico, Víctor y Che por crecer y madurar juntos y por compartir momentos inolvidables. A Seba y Eli por las incontables alegrías disfrutadas en su departamento; a Edo por su ayuda y preocupación en mantenernos juntos a todos; a Huaso y Poli, por su motivación y alegría en cada encuentro; a Alonso, por su cariño a pesar de la distancia; a Pascal por ser mi conciencia inconsciente y a Feña por su cariño y por mantener siempre el contacto.

Gracias a todos por estar conmigo durante esta etapa y por ayudarme a crecer y ser mejor persona cada día.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Carlos A. Santiviago y el Dr. Sergio A. Álvarez.

La tesis contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT 1140754 y 1171844 y la Beca CONICYT para Estudios de Magíster Nacional folio 22140758. La pasantía realizada en el laboratorio de la Dra. France Daigle (Université de Montréal, Québec, Canada) fue financiada por una Beca de Estadías Cortas de Investigación de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile, convocatoria 2015-2016.

PUBLICACIONES

Sebastián Riquelme, Macarena Varas, Camila Valenzuela, Paula Velozo, Nicolás Chahin, Paulina Aguilera, **Andrea Sabag**, Bayron Labra, Sergio A. Álvarez, Francisco P. Chávez and Carlos A. Santiviago. (2016). “Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella* Typhimurium to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*”. *Front. Microbiol.* **7**:1305. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01305

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Andrea Sabag, Sebastián Riquelme, Camila Valenzuela, Cristian Bravo, Verónica Barra, Víctor Martínez, Juan Ugalde, Francisco Chávez, Rocio Canals, Prerak Desai, Michael McClelland, Sergio A. Álvarez and Carlos A. Santiviago. “Comparative analysis of genes involved in intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages and amoeba *Dictyostelium discoideum*”. ASM Microbe 2016, 16 al 20 de Junio, Boston, Massachusetts, USA.

Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Sebastián Riquelme and Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium Δ sopB and Δ sifA mutants are impaired in intracellular survival in the amoeba *Dictyostelium discoideum*”. ASM Microbe 2016, 16 al 20 de Junio, Boston, Massachusetts, USA.

Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Macarena Varas, Ítalo Urrutia, Constanza Morgado, Bayron Labra, Francisco P. Chávez and Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium requires SopB and SifA to survive intracellularly in a vacuolar compartment in *Dictyostelium discoideum*”. 5th ASM Conference on *Salmonella*, 29 de Agosto al 1 de Septiembre, 2016, Potsdam, Alemania.

Andrea Sabag, Bayron Labra, Ítalo Urrutia, Sebastián Riquelme, Paula Velozo, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Rol del efector PipD en la internalización de *Salmonella* Typhimurium en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2016), 26 al 30 de Septiembre, 2016, Rosario, Argentina.

Ítalo M. Urrutia, Bayron Labra, **Andrea Sabag**, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Contribución del sistema de secreción Twin-arginine translocation (Tat) en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*”. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2016), 26 al 30 de Septiembre, 2016, Rosario, Argentina.

Bayron Labra, **Andrea Sabag**, Camila Valenzuela, Ítalo Urrutia, Sebastián Riquelme, Steffen Porwollik, Michael McClelland, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Genome-wide identification of genes required for the intracellular survival of *S. Typhimurium* in the amoeba *D. discoideum*”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9 al 13 de Julio, 2017, Valencia, España.

Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Ítalo Urrutia, Macarena Varas and Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium requires SopB and SifA to survive intracellularly in a SCV-like compartment in *Dictyostelium discoideum*”. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9 al 13 de Julio, 2017, Valencia, España.

Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Ítalo M. Urrutia, Magdalena Gil, Macarena Varas, Jost Enninga and Carlos A. Santiviago. “*Salmonella* Typhimurium requires SopB and SifA to survive intracellularly in a SCV-like compartment in *Dictyostelium discoideum*”. International *Dictyostelium* Conference 2017, 20 al 24 de Agosto, 2017, Ginebra, Suiza.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Andrea Sabag, Sebastián Riquelme, Camila Valenzuela, Cristian Bravo, Verónica Barra, Víctor Martínez, Juan Ugalde, Sergio A. Álvarez, Carlos A. Santiviago. “Genome-wide identification of genes required for *S. Typhimurium* to survive in murine macrophages by the analysis of a single-gene deletion mutant library”. XXXVII Congreso Chileno de Microbiología, 1 al 4 de Diciembre 2015, La Serena, Chile.

Andrea Sabag, Ítalo M. Urrutia, Bayron Labra, Camila Valenzuela, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. “Participación de la isla de patogenicidad SPI-5 en la internalización y supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en

macrófagos murinos RAW264.7". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016, Valdivia, Chile.

Ítalo M. Urrutia, Beatriz Salas, Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Bayron Labra, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. "Contribución de SopB, SptP y PphB en la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en *Dictyostelium discoideum* y macrófagos RAW264.7". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016, Valdivia, Chile.

Macarena Varas, Camila Valenzuela, Sebastián Riquelme, Javiera Ortiz-Severín, Fariña A, Andrés Marcoleta, Paulina Aguilera, **Andrea Sabag**, Miguel Allende, Carlos A. Santiviago y Francisco P. Chávez. "El rol de los polifosfatos inorgánicos en la interacción patógeno-hospedero *in vivo* entre *Salmonella* Typhimurium y diferentes modelos biológicos". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016, Valdivia, Chile.

Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Macarena Varas, Ítalo M. Urrutia, Constanza Morgado, Bayron Labra, Francisco P. Chávez y Carlos A. Santiviago. "*Salmonella* Typhimurium requiere a los efectores SopB y SifA para sobrevivir intracelularmente en un compartimento vacuolar en *Dictyostelium discoideum*". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016, Valdivia, Chile.

Bayron Labra, Sebastián Riquelme, Paula Velozo, Camila Valenzuela, **Andrea Sabag**, Ítalo M. Urrutia, Steffen Porwollik, Michael McClelland, Sergio A. Álvarez y Carlos A. Santiviago. "Identificación a escala genómica de genes necesarios para la supervivencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la ameba *Dictyostelium discoideum*". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de Noviembre, 2016, Valdivia, Chile.

Andrea Sabag, Bayron Labra, Camila Valenzuela, Fernando Amaya, Steffen Porwollik, Michael McClelland, Sergio A. Álvarez and Carlos A. Santiviago. "High-throughput identification of genes required for intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages and *Dictyostelium*

discoideum". XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 18 de Noviembre 2017, La Serena, Chile.

Ítalo M. Urrutia, Beatriz Salas, **Andrea Sabag**, Camila Valenzuela, Sergio Álvarez, Ricardo Escalante, Carlos A. Santiviago. "*Salmonella* Typhimurium virulence factors SopB, SptP and PphB contribute to subvert autophagy in *Dictyostelium discoideum* and RAW264.7 macrophages". XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 18 de Noviembre 2017, La Serena, Chile.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	X
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XIX
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2.- Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	2
1.3.- <i>Salmonella</i> y su interacción con macrófagos	4
1.4.- <i>Salmonella</i> y su interacción con protozoos	6
1.5.- Nuevas herramientas para el estudio de <i>Salmonella</i> a escala genómica	8
1.6.- Diseño experimental	10
2.- HIPÓTESIS	11
3.- OBJETIVO GENERAL	11
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1.- Reactivos	12
5.2.- Cepas bacterianas	13
5.2.1.- Genoteca de mutantes por delección de genes individuales de <i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s (SGD-K).....	13
5.2.2.- Genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s.	14
5.3.- Líneas celulares eucariontes	15
5.4.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano	15
5.5.- Medios y condiciones de cultivo celular	16
5.5.1.- Macrófagos murinos RAW264.7	16

5.5.2.- <i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	16
5.6.- Partidores y oligonucleótidos.....	17
5.7.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando la genoteca de mutantes SGD-K de <i>S. Typhimurium</i>	18
5.8.- Generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante el sistema <i>MiSeq</i> de <i>Illumina</i>	20
5.8.1.-Extracción de DNA genómico	20
5.8.2.-Digestión con enzima de restricción.....	22
5.8.3.-Ligación de oligonucleótidos adaptadores	22
5.8.4.-Amplificación de fragmentos mediante PCR.....	23
5.8.5.-Electroforesis y purificación de DNA en geles de agarosa.....	25
5.8.6.-Secuenciación masiva de DNA mediante el sistema <i>MiSeq</i> de <i>Illumina</i>	25
5.8.7.-Expresión de resultados y análisis de datos	26
5.9.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando una genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>S. Typhimurium</i>	26
5.10.- Secuenciación masiva de DNA de la genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>S. Typhimurium</i> 14028s.....	27
5.10.1.- Análisis de los datos de la secuenciación.....	28
5.11.- Construcción de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> 14028s mediante método de <i>Red-swap</i>	30
5.11.1.- Amplificación del <i>cassette</i> de resistencia a antibiótico mediante PCR.....	30
5.11.2.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación con DNA plasmidial	31
5.11.3.- Mutagénesis por intercambio alélico con productos de PCR.....	32
5.11.4.- Verificación de las mutantes obtenidas	32
5.12.- Transducción de alelos mutantes en <i>S. Typhimurium</i> 14028s.....	33
5.12.1.- Preparación del lisado de P22.....	33

5.12.2.- Transducción	34
5.12.3.- Selección de transductantes.....	34
5.13.- Ensayos de competencia <i>in vitro</i> entre cepas de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos murinos RAW264.7 y <i>D. discoideum</i> AX4.....	35
5.13.1.- Condiciones generales	35
5.13.2.- Ensayo de competencia <i>in vitro</i> en macrófagos RAW264.7	35
5.13.3.- Ensayo de competencia <i>in vitro</i> en <i>D. discoideum</i>	36
5.13.4.- Expresión de resultados y análisis estadístico	37
6.- RESULTADOS	38
6.1.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando la genoteca SGD-K de <i>S. Typhimurium</i>	38
6.2.- Construcción de genotecas para secuenciación masiva de DNA genómico mediante el sistema <i>MiSeq</i> de <i>Illumina</i>	39
6.3.- Secuenciación masiva de las genotecas y análisis de datos generados.	44
6.4.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando una genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>S. Typhimurium</i>	45
6.5.- Identificación global de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> que presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7.	48
6.6.- Análisis comparativo de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba <i>D. discoideum</i>	53
6.7.- Mutantes de genes de <i>S. Typhimurium</i> relacionados con la biosíntesis y modificaciones del LPS son atenuados en macrófagos murinos y en la ameba <i>D. discoideum</i>	57
7.- DISCUSIÓN	62
8.- CONCLUSIONES	81
9.- BIBLIOGRAFÍA	82
10.- ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	13
Tabla 2.	Líneas celulares utilizadas en esta tesis.	15
Tabla 3.	Partidores y oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	17
Tabla 4.	Datos de infecciones mediante ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 con la genoteca de mutantes SGD-K de <i>S. Typhimurium</i>	39
Tabla 5.	Pureza y concentración de las muestras de gDNA obtenidas.....	41
Tabla 6.	Datos de infecciones mediante ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 con la genoteca de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> por transposición.....	46
Tabla 7.	Pureza y concentración de las muestras de gDNA obtenidas.....	48
Tabla A.	Lista de genes de <i>S. Typhimurium</i> requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7	91
Tabla B.	Lista de genes de <i>S. Typhimurium</i> requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y la ameba <i>D. discoideum</i>	109

FIGURAS

Figura 1.	Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	3
Figura 2.	Esquema de la estructura de las mutantes por delección de genes individuales de la genoteca SGD-K.....	14
Figura 3.	Esquema de la estructura de las mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>S. Typhimurium</i> 14028s	15
Figura 4.	Esquema del ensayo de protección a gentamicina usando macrófagos murinos RAW264.7 infectados con cepas de <i>S. Typhimurium</i>	19
Figura 5.	Esquema del protocolo usado para la generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante <i>MiSeq</i> de <i>Illumina</i>	21

Figura 6.	Esquema de amplificación usado para la generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante <i>HiSeq</i> de <i>Illumina</i>	28
Figura 7.	Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos RAW264.7 con la genoteca de mutantes SGD-K de <i>S. Typhimurium</i>	39
Figura 8.	Esquema de la estructura de las mutantes presentes en la genoteca SGD-K y regiones utilizadas para generar una genoteca para secuenciación masiva	40
Figura 9.	Geles representativos de las distintas etapas del protocolo de generación de genotecas para secuenciación.	43
Figura 10.	Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos RAW264.7 con la genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en <i>S. Typhimurium</i>	47
Figura 11.	Integridad de las muestras de gDNA obtenidas.	49
Figura 12.	Categorías funcionales de las proteínas codificadas por genes de <i>S. Typhimurium</i> cuyas mutantes presentan selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 luego de 6 h post-infección.....	52
Figura 13.	Genes de <i>S. Typhimurium</i> 14028s bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba <i>D. discoideum</i>	54
Figura 14.	Categorías funcionales de las proteína codificadas por genes de <i>S. Typhimurium</i> cuyas mutantes presentan selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba <i>D. discoideum</i>	55
Figura 15.	Ensayos de competencia <i>in vitro</i> entre la cepa silvestre y las cepas mutantes Δ <i>arnBCADTEF</i> , Δ <i>waaL</i> , Δ <i>aroA</i> , Δ <i>wzz_{lepE}</i> y Δ <i>wzz_{ST}</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s en macrófagos murinos RAW264.7.....	58
Figura 16.	Ensayos de competencia <i>in vitro</i> entre la cepa silvestre y las cepas mutantes Δ <i>arnBCADTEF</i> , Δ <i>waaL</i> , Δ <i>aroA</i> , Δ <i>wzz_{lepE}</i> y Δ <i>wzz_{ST}</i> de <i>S. Typhimurium</i> 14028s en <i>D. discoideum</i>	59
Figura 17.	Estructura del LPS de <i>S. Typhimurium</i> y sus modificaciones.....	70
Figura 18.	Regulación de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de undecaprenilfosfato-L-Ara4N y la transferencia del grupo L-Ara4N al lípido A del LPS de <i>S. Typhimurium</i>	76
Figura 19.	Contribución de los genes <i>waaL</i> , <i>arnBCADTEF</i> y <i>wzz_{ST}</i> a la resistencia bacteriana frente a péptidos catiónicos antimicrobianos producidos por macrófagos y amebas.	79

ABREVIATURAS

Amp:	Ampicilina
Ara4N:	4-aminoarabinosa
°C:	Grados Celsius
COGs:	<i>Clusters of orthologous groups of proteins</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DO _{600nm} :	Densidad óptica medida a 600 nm
DOC:	Desoxicolato de sodio
EDTA:	Ácido etilendiamonotetraacético
g:	Gramos
gDNA:	DNA genómico
Gen:	Gentamicina
g/L:	Gramos por litro
h:	Horas
IC:	Índice de competencia
Kan:	Kanamicina
kb:	Kilobases
kDa:	Kilodaltons
L:	Litros
LB:	Caldo Luria-Bertani
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
MOI:	Multiplicidad de Infección
pb:	Pares de bases
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v:	Peso/volumen
rpm:	Revoluciones por minuto
seg:	Segundos
SGD-K:	<i>Single-gene deletion Kan^R</i>

SPI:	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
STM:	<i>Signature-tagged mutagenesis</i>
Str:	Estreptomicina
TAE:	Solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA
T3SS:	Sistema de secreción de tipo 3
T6SS:	Sistema de secreción de tipo 6
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultra violeta
v/v:	Volumen/volumen
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros

RESUMEN

Salmonella es un patógeno intracelular capaz de generar cuadros clínicos que incluyen desde una enteritis autolimitada hasta infecciones sistémicas que pueden provocar la muerte del hospedero. Una vez dentro del organismo, la bacteria atraviesa la barrera epitelial intestinal e interactúa con células fagocíticas profesionales del sistema inmune innato, causando una respuesta inflamatoria local que culmina en la excreción del patógeno al medio ambiente. La patogenicidad de *Salmonella* se debe principalmente a su capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos y células dendríticas, los cuales participan como vectores de diseminación dentro del hospedero. Los mecanismos utilizados por esta bacteria para permanecer y replicarse dentro de los macrófagos han sido ampliamente estudiados y descritos en la literatura. Sin embargo, existe escasa información referente a los mecanismos de supervivencia que emplea en otros estadios de su ciclo de vida. Por ejemplo, en el medio ambiente *Salmonella* interactúa con otras células fagocíticas eucariontes capaces de alimentarse de bacterias y hongos. Entre ellas destacan las amebas, que utilizan mecanismos de endocitosis y degradación bacteriana similares a los utilizados por células del sistema inmune innato.

En esta tesis, nos propusimos identificar un conjunto común de genes requeridos para la supervivencia intracelular de *Salmonella* Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum*. Este estudio se realizó mediante el análisis masivo de mutantes bajo selección negativa utilizando distintas genotecas de mutantes. La detección de aquellas mutantes que presentaron defectos en la supervivencia intracelular en ambas células fagocíticas se realizó mediante secuenciación masiva de DNA. En primera instancia, logramos identificar mutantes en 719 genes de *S. Typhimurium* bajo selección negativa en macrófagos murinos. Entre ellos, se encontraron genes codificados en islas de patogenicidad conservadas dentro *Salmonella*, genes relacionados con biosíntesis y transporte de aminoácidos y carbohidratos, genes relacionados con reguladores de respuesta a estímulos externos, genes involucrados en la biosíntesis y modificación del

lipopolisacárido (LPS) y genes relacionados con estrés nutricional y oxidativo, entre otros.

Al comparar estos datos con una base de datos de mutantes con defectos en la supervivencia intracelular en *D. discoideum* generada en nuestro laboratorio, logramos identificar mutantes en 213 genes de *S. Typhimurium* que serían necesarios para la supervivencia intracelular del patógeno en ambas células fagocíticas. Dentro de este grupo encontramos genes codificados en islas de patogenicidad conservadas del género *Salmonella* (SPI-1 y SPI-3), genes involucrados en la captación de hierro (*iroC*, *iroN* y *feoB*), genes relacionados con la respuesta a estrés por hambruna y pH ácido (*spoT* y *adiY*) y genes asociados a la biosíntesis y modificación del LPS (*waaB*, *waaI*, *waaJ*, *waaL*, *waaZ*, *wbaC*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaN*, *wbaD*, *oafA*, *wzz_{lepE}* y genes del operón *arn*), entre otros.

Con el propósito de confirmar algunas de las predicciones obtenida a partir de nuestro análisis comparativo, se escogieron mutantes relacionadas con la biosíntesis y modificación del LPS y se evaluó su supervivencia intracelular en ambos modelos de infección. Nuestros resultados demostraron que las mutantes $\Delta waaL$, Δwzz_{ST} y $\Delta arnBCADTEF$ presentaron defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos y *D. discoideum*. Por lo tanto, la presencia de un LPS completo que posea 16 a 35 unidades de AgO (L-AgO) sería necesario para la supervivencia de este patógeno en macrófagos murinos y *D. discoideum*. De igual forma, la modificación del LPS correspondiente a la adición de un grupo 4-aminoarabinosa al lípido A contribuiría a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en ambas células fagocíticas.

En conjunto, los resultados de esta tesis constituyen un primer acercamiento a los mecanismos moleculares empleados por *S. Typhimurium* para sobrevivir en reservorios tan distintos como mamíferos y protozoos ambientales.

ABSTRACT

Comparative analysis of genes required for the intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages and *Dictyostelium discoideum*

Salmonella is an intracellular pathogen that causes a variety of illnesses ranging from self-limiting gastroenteritis to severe systemic infections that can cause the death of the host. Once inside the organism, these bacteria can cross the epithelial barrier and interact with professional phagocytic cells of the innate immune system, causing a local inflammatory response which culminates in the excretion of the pathogen to the environment. The pathogenicity of *Salmonella* is associated with its ability to survive in macrophages and dendritic cells, which can act as dissemination vectors inside the host. The molecular mechanisms used for these bacteria to survive and replicate in macrophages have been widely studied. However, no in-depth study has been conducted in order to understand the molecular mechanisms required for *Salmonella* survival in other stages of its life cycle. For instance, in the environment *Salmonella* interacts with other phagocytic cells that feed on bacteria and fungus. Among these, the amoebae use similar endocytic and degradation mechanisms to those described in innate immune cells.

In this thesis, we aimed to identify a common group of genes required for the intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium in murine macrophages and the amoeba *Dictyostelium discoideum*. To this end, we performed a high-throughput analysis of mutants under negative selection using different mutant libraries. The identification of mutants unable to survive intracellularly in both phagocytic cells was carried out by deep-sequencing. First, we identified 719 mutants of *S. Typhimurium* under negative selection in murine macrophages. These mutants included genes encoded in pathogenicity islands conserved in the *Salmonella* genus, genes involved in transport and biosynthesis of amino acids and carbohydrates, genes encoding regulators associated with response to external signals, genes linked to biosynthesis and modification of lipopolysaccharide (LPS) and genes associated to nutritional and oxidative stress, among other.

The comparative analysis between the data of this thesis and data obtained in our laboratory that identified mutants with defects in intracellular survival in *D. discoideum*, allow us the identification of mutants in 213 genes of *S. Typhimurium* required to survive intracellularly in both phagocytic cells. Within this group, we found genes encoded in *Salmonella* pathogenicity islands (SPI-1 and SPI-3), genes involved in iron uptake (*iroC*, *iroN* and *feoB*), genes related with response to starvation and acid pH (*spoT* and *adiY*) and genes associated to LPS biosynthesis and modification (*waaB*, *waaL*, *waaJ*, *waaZ*, *wbaC*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaN*, *wbaD*, *oafA*, *wzz_{fepE}* and genes in the *arn* operon), among other.

To confirm predictions from our comparative analysis, we choose mutants involved in LPS biosynthesis and evaluated their intracellular survival in both infection models. We demonstrated that mutants $\Delta waaL$, Δwzz_{ST} and $\Delta arnBCADTEF$ are deficient in intracellular survival in murine macrophages and *D. discoideum*. Hence, a complete LPS containing 16 to 35 AgO units (L-AgO) would be necessary for survival of this pathogen in murine macrophages and *D. discoideum*. Similarly, a modified LPS containing 4-deoxy-aminoarabinose bound to lipid A would contribute to the intracellular survival of *S. Typhimurium* in both phagocytic cells.

Overall, our results constitute a first step towards understanding the molecular mechanisms exploited by *S. Typhimurium* in order to survive in strikingly different niches such as mammals and environmental protozoa.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades de *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se divide en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. En conjunto, ambas especies incluyen a más de 2.500 serovares que se diferencian por sus propiedades antigénicas (**Popoff et al., 2004**). La especie *S. enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Los serovares pertenecientes a la subespecie *enterica* son responsables de más del 99% de los casos de salmonelosis en animales de sangre caliente, causando enfermedades que incluyen desde cuadros de gastroenteritis autolimitada hasta cuadros de fiebre entérica que pueden provocar la muerte del hospedero (**Chen et al., 2013**). La severidad de los cuadros clínicos de *S. enterica* es altamente variable y depende principalmente del serovar que infecta y las condiciones inmunológicas del hospedero. Los serovares de *Salmonella* se pueden agrupar en dos categorías según el rango de hospedero al cual infectan. Existen serovares “especialistas” que presentan un espectro limitado de hospedero o incluso un hospedero específico, como *S. Typhi* y *S. Gallinarum*, que infectan sólo a humanos y aves, respectivamente. Por su parte, los serovares “generalistas” afectan a un amplio rango de hospederos incluyendo aves de corral, roedores, bovinos e incluso humanos. Dentro de esta categoría destacan los serovares “no tifoidales” de *Salmonella* (NTS), como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, los cuales generan alrededor de 93,8 millones de cuadros de gastroenteritis aguda y 155.000 muertes anuales a nivel mundial (**Majowicz et al., 2010**). Estos serovares provocan bacteremias severas en regiones de África sub-sahariana, afectando principalmente a niños menores de 5 años, ancianos e individuos inmunocomprometidos (**Morpeth et al., 2009**). Además, se ha reportado que pacientes infectados con *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* pueden desarrollar dolores en las articulaciones e irritaciones en los ojos, dando origen a una enfermedad denominada artritis reactiva, cuya duración puede extenderse por años (**Tuompo et al., 2013**).

El serovar de *Salmonella* más estudiado es *S. Typhimurium*. Este serovar causa cuadros de gastroenteritis cuya manifestación se caracteriza por la presencia de náuseas, vómito y diarrea inflamatoria causada por una infiltración masiva de neutrófilos en el íleon y el colon. El período de incubación comprende entre 12 a 72 h, seguido de los síntomas de la enfermedad que duran menos de 10 días en individuos inmunocompetentes (**Raffatellu et al., 2006**). En cambio, individuos inmunocomprometidos infectados con *S. Typhimurium* pueden desarrollar bacteremias severas que pueden desencadenar sepsis y muerte del hospedero. Una situación similar se ha reportado en ratones susceptibles a infección, donde *S. Typhimurium* es capaz de colonizar órganos internos como bazo e hígado generando infecciones sistémicas, cuyos síntomas son parecidos a la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* en humanos. Por otra parte, en los últimos años se han identificado cepas de *S. Typhimurium* resistentes a múltiples antibióticos a partir de muestras de pacientes infectados y de diversos animales de producción en países desarrollados (**Meakins et al., 2008**). Esta situación es alarmante considerando el incipiente aumento de infecciones con estas cepas pudiendo comprometer la efectividad de los tratamientos, especialmente en niños y pacientes inmunocomprometidos.

1.2.- Ciclo infectivo de *Salmonella*

El ciclo infectivo de *Salmonella* se inicia a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados (**Figura 1**). Una vez dentro del hospedero, sobrevive al pH ácido del estómago e interactúa con células epiteliales intestinales y células del sistema inmune innato a través de dos sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) codificados en las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2. El T3SS_{SPI-1} es requerido para la invasión de células fagocíticas y no fagocíticas (**Monack et al., 1996; Raffatellu et al., 2006**), dado que promueve la internalización de la bacteria a través de la inyección de proteínas efectoras que alteran la organización del citoesqueleto de las células eucariontes. Una vez cruzada la barrera intestinal, los macrófagos y células dendríticas presentes en la submucosa reconocen a *Salmonella* mediante sus receptores TLR4 y TLR5 (*Toll-Like Receptors*), los cuales identifican patrones

moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*) como el lípido A del lipopolisacárido (LPS) y el flagelo (**Raffatellu et al., 2006**). De esta manera, *Salmonella* ingresa a los macrófagos donde expresa el T3SS_{SPI-2}. Este sistema es requerido para la supervivencia de la bacteria dentro de los macrófagos, permitiendo su replicación y posterior diseminación sistémica en el hospedero (**Haraga et al., 2008**).

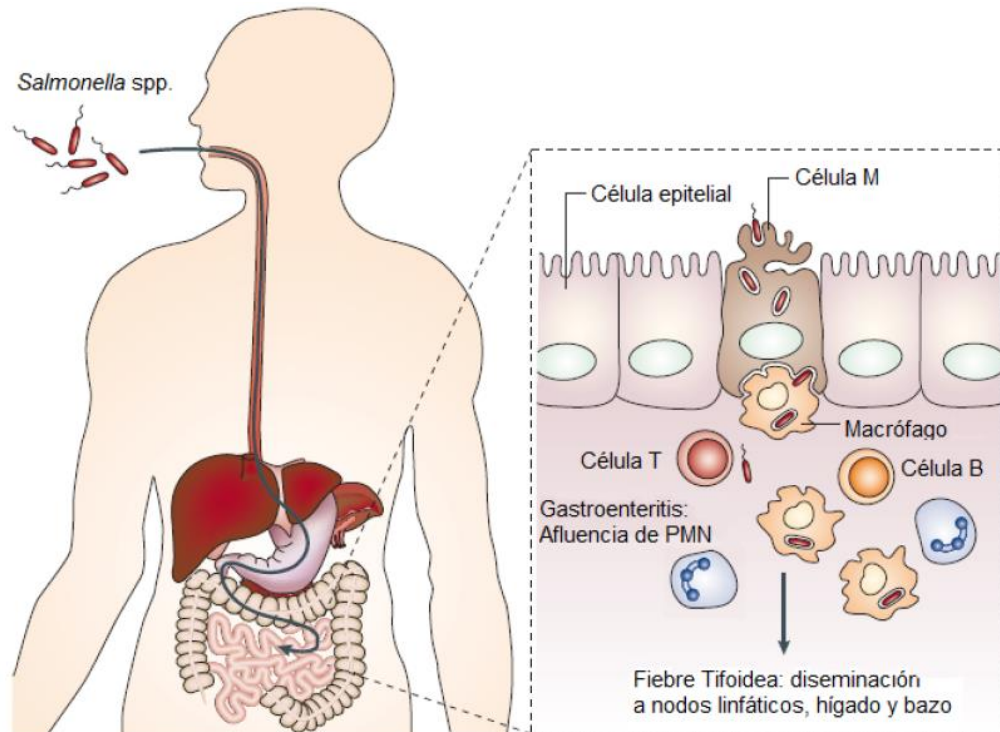


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Salmonella*. Luego de ser ingerida, *Salmonella* sobrevive al pH ácido del estómago y coloniza la región distal del intestino delgado (el íleon). En este lugar interactúa con células epiteliales y células M para promover su internalización mediante la acción del T3SS_{SPI-1}. En la submucosa, *Salmonella* interactúa con células del sistema inmune innato como células dendríticas y macrófagos, donde es capaz de sobrevivir y replicarse con la ayuda del T3SS_{SPI-2}. Los serovares de *Salmonella* capaces de generar infección sistémica utilizan estas células para diseminarse dentro del hospedero colonizando órganos como hígado, bazo y vesícula biliar, causando cuadros de fiebre tifoidea y bacteremia severa. Los serovares que causan cuadros de gastroenteritis generan una respuesta inflamatoria local que culmina con la eliminación de la bacteria del hospedero. Esquema modificado de **Haraga et al., 2008**.

Las islas de patogenicidad mencionadas han sido las más estudiadas hasta el momento y forman parte de un total de 23 SPIs reportadas en el género *Salmonella* (Desai et al., 2013) (**Sabbagh et al., 2010**). Entre ellas, las islas SPI-1 a la SPI-5 son

conservadas en la subespecie *enterica* mientras que las demás islas presentan una distribución diferencial en los diferentes serovares de esta subespecie.

1.3.- *Salmonella* y su interacción con macrófagos

La capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos es un evento crítico para la patogenicidad de *Salmonella*. La entrada de *S. Typhimurium* a estas células se genera a través de procesos endocíticos dependientes de la isla SPI-1 o independientes de ésta, como la macropinocitosis (**Haraga et al., 2008**). Una vez dentro del macrófago, la bacteria permanece en el interior de un fagosoma modificado, denominado “vacuola contenedora de *Salmonella*” (SCV). Para esto, *Salmonella* secreta proteínas efectoras al citoplasma a través de sus dos T3SS, las cuales alteran la fusión endosoma-lisosoma, permitiendo la permanencia de *Salmonella* dentro de la SCV (**Ramos-Morales, 2012**). Se ha observado que en ratones susceptibles a infección, la isla SPI-2 de *S. Typhimurium* es esencial para la replicación y la formación de SCV dentro de macrófagos, eventos que se ven mermados en cepas carentes de esta isla (**Richter-Dahlfors et al., 1997; Hensel et al., 1998**). Otra isla de patogenicidad que contribuye a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos es la isla SPI-3. Esta isla contiene el operón *mgtCB*, el cual codifica proteínas de membranas transportadoras de Mg^{2+} (**Blanc-Potard et al., 1999**). Se ha observado que mutantes de esta isla presentan defectos en la virulencia en ratones, supervivencia en medios limitantes de Mg^{2+} y en el interior de macrófagos (**Blanc-Potard and Groisman, 1997**).

La expresión de los genes presentes en estas islas de patogenicidad es modulada por reguladores globales que actúan en respuesta a diferentes condiciones ambientales. El sistema de regulación de mayor importancia es el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Este sistema detecta concentraciones bajas de Mg^{2+} y pH ácido en el medio, con el fin de modular la virulencia de *Salmonella*. Dentro de los macrófagos existe una limitación de nutrientes como purinas, pirimidinas, glutamina, histidina, metionina y Mg^{2+} (**Blanc-Potard and Groisman, 1997**). En este nicho, el sistema PhoP/PhoQ regula la expresión de genes de la isla SPI-2 y de efectores secretados por el T3SS_{SPI-2} y modula

directamente la transcripción del operón *mgtCB* de la isla SPI-3, entre otros (**Blanc-Potard and Groisman, 1997; Fass and Groisman, 2009**). Sumado al ambiente adverso presente en el interior de la SCV, los macrófagos tienen la capacidad de generar potentes mecanismos antimicrobianos que favorecen la eliminación de patógenos intracelulares. Entre ellos destacan las especies reactivas de oxígeno generadas principalmente por el complejo NADPH oxidasa y especies reactivas de nitrógeno producidas por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual genera óxido nítrico utilizando L-arginina como sustrato. Sin embargo, *Salmonella* se ha adaptado a estas condiciones y ha generado mecanismos para evitar su degradación. Por ejemplo, efectores del T3SS_{SPI-2} que son secretados al citoplasma de los macrófagos, evitarían el tráfico de vesículas que contienen NADPH oxidasa hacia la SCV (**Vazquez-Torres et al., 2000; Vazquez-Torres and Fang, 2001**).

Estudios a escala genómica no sólo han permitido identificar estas islas de patogenicidad, sino que también otros factores de virulencia implicados en la interacción entre diferentes serovares de *Salmonella* y el sistema inmune innato. Investigaciones realizadas en macrófagos humanos infectados con *S. Typhi* han identificado genes relacionados con la envoltura celular, biosíntesis/degradación de proteínas y ácidos nucleicos, metabolismo energético y varios genes que codifican proteínas de función desconocida (**Sabbagh et al., 2012**). En *S. Typhimurium*, genes codificados tanto en la isla SPI-2 como genes presentes en otras regiones del genoma y que son co-regulados con los genes de esta isla, están implicados en la supervivencia dentro de macrófagos murinos. Entre ellos destaca el gen *sifA*, el cual está relacionado con la formación de filamentos membranosos que mantienen íntegra la SCV (**Chan et al., 2005; Jackson et al., 2008**). Además, varios genes relacionados con la isla SPI-1 son requeridos en este nicho, tales como: genes que codifican componentes estructurales de la maquinaria de secreción (*invA*, *invG*, *prgK*, *prgH*), genes que regulan la expresión de los genes de la isla SPI-1 (*hilA*, *hilC*, y *hilD*), genes que codifican proteínas efectoras (*sipA*, *sipB*, *sopB*, *sopD* y *sopE2*) y genes que codifican el sistema regulador de dos componentes SirA/BarA, reconocido por regular la expresión de la isla SPI-1 (**Chan et al., 2005**).

1.4.- *Salmonella* y su interacción con protozoos

Una parte del ciclo infeccioso de *Salmonella* que no ha sido estudiado en profundidad se relaciona con su persistencia en el medio ambiente. Antes de iniciar su ciclo infeccioso, *Salmonella* permanece gran parte del tiempo en el ambiente compartiendo con una amplia variedad de bacterias, plantas y protozoos. Estos últimos corresponden a organismos eucariontes unicelulares que viven en suelos y medios acuáticos y se alimentan principalmente de bacterias y hongos, actuando como verdaderos depredadores ambientales. Para resistir la depredación, las bacterias han tenido que desarrollar mecanismos para evitar la fagocitosis o la degradación una vez dentro de los protozoos. Se ha observado que distintas enterobacterias, como *Escherichia coli* y *Salmonella*, tienen la habilidad de sobrevivir en el interior de vacuolas de diferentes especies de *Acanthamoeba* (**Gaze et al., 2003; Tezcan-Merdol et al., 2004**). Incluso, se ha observado que ciertos patógenos bacterianos recuperados desde estos organismos podrían aumentar su virulencia, mejorando la capacidad de generar enfermedades en hospederos más complejos. Por ejemplo, estudios realizados en bacterias como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium* han demostrado un aumento en la virulencia e invasión en macrófagos humanos luego de ser recuperadas desde la ameba *A. castellanii* (**Cirillo et al., 1994; Cirillo et al., 1997**). Por otro lado, las amebas otorgarían protección frente a diversas condiciones ambientales desfavorables para las bacterias. Por ejemplo, el protozoo *A. castellanii* que vive en suelos y sistemas acuáticos es capaz de fagocitar a *S. Typhimurium* protegiéndola de procesos de cloración en tratamientos de agua (**King et al., 1988**). En base a lo anterior, las amebas actuarían como reservorios ambientales de bacterias patógenas, favoreciendo su proliferación y transmisión a animales y humanos.

Las amebas se alimentan de bacterias a través de procesos fagocíticos similares a los establecidos en macrófagos. Estos mecanismos han perdurado durante la evolución, manteniéndose bastante conservados entre diversas células eucariontes (**Steinert et al., 2003; Cosson and Lima, 2014**). Debido a que ambos tipos celulares han sido catalogados como fagocitos profesionales, es lógico pensar

que las bacterias deben utilizar mecanismos moleculares similares para evitar la fagocitosis y poder sobrevivir dentro de amebas y macrófagos. Estudios realizados en *L. pneumophila* han demostrado que el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) Icm/Dot y muchos de sus efectores, descritos inicialmente como requeridos para el crecimiento intracelular en macrófagos humanos, también serían necesarios para sobrevivir en numerosas especies de amebas, incluyendo *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *Dictyostelium discoideum* (Gao et al., 1997; Segal and Shuman, 1999; Escoll et al., 2013). Respecto a *S. Typhimurium*, se demostró que mutantes de la isla SPI-2 (Δ ssaU) y *phoP* presentan menor supervivencia intracelular en *A. polyphaga* a tiempos largos de infección (Bleasdale et al., 2009). Igualmente, análisis transcriptómicos comparativos de *S. Typhimurium* realizados en el protozoo *Tetrahymena* y en macrófagos murinos *in vitro* revelaron que genes relacionados con la isla SPI-2, estrés oxidativo, estrés osmótico, resistencia a drogas, privación de fosfato, transporte de Mg^{2+} y metabolismo anaerobio son sobre-expresados en ambos organismos. Asimismo, se identificaron 49 proteínas hipotéticas sin función conocida que serían relevantes para la supervivencia tanto en macrófagos como en estos protozoos (Rehfuss et al., 2011).

El protozoo de interés para esta tesis es *Dictyostelium discoideum*, una ameba social cuyo hábitat natural es el suelo de bosques. Esta ameba presenta un ciclo de vida complejo con diferentes etapas de desarrollo social, que incluyen desde un crecimiento vegetativo como organismo unicelular hasta la formación de un cuerpo fructífero multicelular. En los últimos años, *D. discoideum* se ha utilizado como modelo de infección debido a que es relativamente fácil de cultivar en el laboratorio, crece a temperatura ambiente, su genoma se encuentra secuenciado y su biología celular está bien caracterizada facilitando su manipulación. Sumado a lo anterior, existe una comunidad científica que cuenta con recursos en línea (como DictyBase y Dicty Stock Center) que facilitan el acceso a información sobre esta ameba, así como a distintas cepas y plasmidios.

En la literatura se ha reportado que diversas bacterias interactúan con esta ameba, incluyendo a *E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *L. pneumophila*

y *M. avium*, entre otras (**Steinert, 2011**). A pesar que numerables bacterias son fagocitadas por *D. discoideum*, son pocos los estudios enfocados en la búsqueda de genes y/o proteínas bacterianas requeridas para la supervivencia dentro de este protozoo. Los primeros estudios realizados en *Salmonella* plantearon que esta bacteria era degradada rápidamente por *D. discoideum* una vez internalizada (**Skriwan et al., 2002**). No obstante, un estudio reciente reveló que *S. Typhimurium* podría inhibir el desarrollo social de *D. discoideum* luego de 3 a 4 días post-infección dependiendo de las condiciones de crecimiento bacteriano (**Sillo et al., 2011**). Además, se observó que mutantes en genes que codifican componentes estructurales del T3SS_{SPI-2} de *S. Typhimurium* son incapaces de inhibir el crecimiento y el desarrollo de la ameba (**Sillo et al., 2011**). Estos resultados sugieren que *salmonella* podría comportarse como patógeno afectando el desarrollo social de *D. discoideum* y que la isla SPI-2 estaría implicada en este proceso. Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio demostraron que *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de *D. discoideum* a diferencia de *E. coli* B/r, bacteria comúnmente utilizada como alimento de la ameba. Además, se observó que mutantes de *S. Typhimurium* en los genes *phoP* y *phoQ* (sistema de dos componentes), *aroA* (síntesis de compuestos aromáticos), *invA* (componente estructural esencial del T3SS_{SPI-1}), *ssaD* (componente estructural esencial de T3SS_{SPI-2}), *waaL* (ligasa del antígeno O del LPS) y *clpV* (chaperona esencial para la secreción de proteínas a través del T6SS_{SPI-6}) presentan defectos en la supervivencia intracelular en la ameba *D. discoideum* (**Riquelme et al., 2016**). Asimismo, se ha reportado que estos genes también son requeridos para la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos (**Fields et al., 1986; Miller et al., 1989; Chan et al., 2005**), sugiriendo que *Salmonella* utiliza mecanismos similares para sobrevivir dentro de diferentes células fagocíticas profesionales.

1.5.- Nuevas herramientas para el estudio de *Salmonella* a escala genómica

Inicialmente, la función de los genes de algún serovar de *Salmonella* se caracterizaba mediante técnicas genéticas convencionales y laboriosas, como mutagénesis por inserción al azar de un transposón y posterior análisis de mutantes

en un gen en particular. Posteriormente, se diseñaron nuevas estrategias genéticas como la técnica denominada *Signature-tagged mutagenesis* (STM). Esta técnica combina la mutagénesis por inserción al azar de un transposón y la selección negativa, permitiendo el análisis de varias mutantes de manera simultánea a través de secuencias únicas presentes en cada transposón (**Hensel et al., 1995; Mazurkiewicz et al., 2006**). La selección negativa se basa en que mutantes de genes no esenciales se pierden de la población inicial luego de un proceso de selección determinado. En otras palabras, la incapacidad de una mutante para superar un ambiente selectivo da cuenta de la importancia del gen correspondiente para sobrevivir en dicho ambiente. Una de las desventajas de la técnica STM es que permite evaluar sólo una pequeña porción del genoma a la vez. Para solucionar este problema, se ha mejorado la técnica cambiando las secuencias únicas del transposón por promotores T7 o SP6 orientados hacia uno de los extremos de la región mutada. De esta manera, se logran obtener transcritos *in vitro* que son únicos para cada mutante y que pueden ser identificados a través de hibridaciones competitivas utilizando microarreglos genómicos. Lamentablemente, este tipo de análisis presenta limitaciones y efectos indeseados a considerar. Uno de ellos es el efecto polar que se puede generar por la inserción misma del transposón, afectando la expresión de genes río arriba o río abajo del gen mutado (**Link et al., 1997**). Esto afecta la interpretación de los datos, ya que el defecto biológico observado podría no reflejar la interrupción del gen en cuestión. Además, esta técnica requiere generar un gran número de mutantes para cubrir la totalidad del genoma bacteriano, las cuales pueden perderse de manera aleatoria dada las condiciones experimentales y no por la propia selección negativa (**Santiviago et al., 2009**). Para evitar estos inconvenientes, actualmente se han construido genotecas de mutantes de *S. Typhimurium* mediante reemplazo alélico de genes individuales a escala genómica, donde cada mutante se ha generado de manera individual para eliminar al mínimo el efecto polar (**Porwollik et al., 2014**). Estas genotecas no superan las 3.800 mutantes, en comparación con las ~50.000 mutantes contenidas en una genoteca de transposones que son requeridas para cubrir el genoma. De esta manera, el número de mutantes a utilizar es considerablemente menor, mejorando la

eficiencia de la detección de genes asociados a un fenotipo relevante en el modelo de selección.

1.6.- Diseño experimental

A pesar que los antecedentes sugieren que *Salmonella* requeriría los mismos mecanismos de patogenicidad para sobrevivir dentro de macrófagos y amebas, en la literatura no hay evidencia de estudios comparativos a escala genómica que permitan establecer un conjunto común de genes bacterianos requeridos para sobrevivir dentro de ambas células fagocíticas.

Considerando estos antecedentes, en esta tesis nos propusimos identificar un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular del patógeno en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*. Para esto, se decidió identificar genes de *S. Typhimurium* requeridos para su supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 utilizando una colección de mutantes generada en una cepa virulenta del patógeno. La comparación entre la población de mutantes capaces de infectar los macrófagos (*input*) y la población de mutantes capaces de sobrevivir durante el proceso de infección (*output*) permite identificar las mutantes que presentan selección negativa, dando cuenta de los genes necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos. El monitoreo de los cambios en las poblaciones de mutantes se realizó mediante secuenciación masiva de DNA y posteriores análisis de abundancia relativa de cada mutante. Usando esta estrategia experimental, en nuestro laboratorio ya se identificaron los genes de *S. Typhimurium* requeridos para su supervivencia intracelular en *D. discoideum*. El posterior análisis comparativo de las mutantes bajo selección negativa en estos modelos de infección nos permitió identificar un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* requeridos para su supervivencia intracelular en ambas células fagocíticas. Finalmente, validamos la información obtenida a partir de los análisis a escala genómica generando mutantes por delección en algunos de los genes identificados y evaluando su supervivencia intracelular en macrófagos murinos y en *D. discoideum*.

2.- HIPÓTESIS

“*Salmonella enterica* serovar Typhimurium requiere un conjunto común de genes para sobrevivir intracelularmente en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum*”

3.- OBJETIVO GENERAL

Identificar un conjunto común de genes requeridos para la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en macrófagos murinos y en la ameba *Dictyostelium discoideum*.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar a escala genómica los genes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involucrados en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7.
- 2.- Identificar un conjunto común de genes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requeridos para su supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *Dictyostelium discoideum*.
- 3.- Confirmar de manera individual la participación de genes requeridos para la supervivencia intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en ambos modelos.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Reactivos

A continuación se indican los insumos utilizados en esta tesis y sus proveedores.

BIOTIUM (CA, USA): GelRed.

Becton, Dickinson and Company (MD, USA): Bacto agar.

Biological Industries (CT, USA): Mezcla Tripsina-EDTA 10X, suero fetal bovino (SFB).

Corning (NY, USA): Medio DMEM 1X, PBS 1X.

Difco Laboratories (MI, USA): Triptona, extracto de levadura.

IDT (IO, USA): Todos los oligonucleótidos y partidores utilizados en esta tesis.

Gibco (NY, USA): Azul de tripán.

Invitrogen Life Technologies (CA, USA): *Taq* DNA polimerasa, proteinasa K.

Illumina (CA, USA): “*MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycles)*”.

Merck (NJ, USA): Cloruro de sodio (NaCl), fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), glucosa, etanol absoluto, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ x 7H₂O), solución amortiguadora TAE 50X, Tritón X-100.

New England Biolabs (MA, USA): “*1 kb DNA ladder*”, “*100 pb DNA ladder*”, “*Low Molecular Weight DNA ladder*”, T4 DNA ligasa, endonucleasa *Acl*.

Qiagen (CA, USA): “*QIAquick PCR purification Kit*”, “*QIAquick Gel Extraction Kit*”.

Sigma Chemical Co (MO, USA): Ampicilina (Amp), gentamicina (Gen), kanamicina (Kan), estreptomicina (Str), “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*”.

Thermo Scientific (HyClone) (IL, USA): Solución antibiótica/antimicótica 100X.

5.2.- Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa bacteriana	Característica	Fuente o referencia
S. Typhimurium 14028s	Cepa silvestre virulenta	Stock de laboratorio
S. Typhimurium 14028s Δ aroA	Δ aroA::Kan	Stock de laboratorio
S. Typhimurium 14028s Δ arnBCADTEF	Δ arnBCADTEF::Kan	Stock de laboratorio
S. Typhimurium 14028s Δ waaL	Δ waaL::Kan	(Riquelme <i>et al.</i> , 2016)
S. Typhimurium 14028s Δ wzz _{fepE} *	Δ wzz _{fepE} ::Kan	Stock del laboratorio
S. Typhimurium 14028s Δ wzz _{ST} *	Δ wzz _{ST} ::Kan	Stock del laboratorio
<i>Escherichia coli</i> B/r (DBS0348878)	Cepa silvestre	dictyBase
<i>Klebsiella aerogenes</i> (DBS0349838)	Cepa silvestre	dictyBase

* Estas cepas se obtuvieron mediante transducción generalizada con el fago P22 desde mutantes previamente generadas en el fondo genético de *S. Typhimurium* LT2 (**Bravo *et al.*, 2008**).

5.2.1.- Genoteca de mutantes por delección de genes individuales de *Salmonella* Typhimurium 14028s (SGD-K)

A partir de una colaboración con los laboratorios del Dr. Michael McClelland (University of California Irvine, CA, USA) y la Dra. Helene Andrews-Polymeris (Texas A&M University, TX, USA), logramos generar una colección de mutantes individuales de *S. Typhimurium* 14028s (**Porwollik *et al.*, 2014**). Cada mutante en la colección contiene un *cassette* de resistencia a Kan (Kan^R) en reemplazo de un gen particular (**Figura 2**). Las mutantes se construyeron mediante una modificación del método de intercambio alélico por recombinación de productos de PCR descrito por Datsenko y Wanner (**Datsenko and Wanner, 2000; Santiviago *et al.*, 2009**). La generación de las primeras ~1000 mutantes y su caracterización mediante métodos moleculares se realizó durante la pasantía postdoctoral del Dr. Carlos A. Santiviago en el laboratorio del Dr. McClelland (**Santiviago *et al.*, 2009**). Actualmente, la colección posee ~3700 mutantes individuales que representan una cobertura cercana al 80% de los genes no esenciales de *S. Typhimurium* 14028s (**Porwollik *et al.*, 2014**). A partir de una

mezcla de cultivos individuales de las mutantes de esta colección se generó la genoteca *Single-gene deletion Kan^R* (SGD-K) analizada en esta tesis.

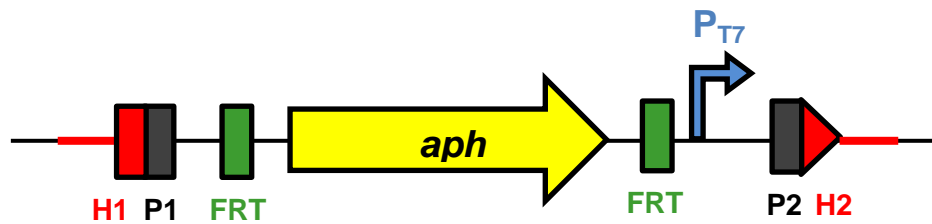


Figura 2. Esquema de la estructura de las mutantes por delección de genes individuales de la genoteca SGD-K. P1 y P2: Secuencias que hibridan con el plasmidio pCLF4 que posee un *cassette* de Kan^R (Secuencias constantes). H1 y H2: Secuencias que hibridan con región que flanquea el gen de interés (secuencias variables). La línea roja representa la secuencia remanente del gen deleciónado. FRT: *flipase recombinase target* (secuencias de reconocimiento de la recombinasa FIp). *aph*: aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (gen que confiere resistencia a kanamicina). P_{T7}: promotor reconocido por la RNA polimerasa del fago T7.

5.2.2.- Genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *Salmonella Typhimurium* 14028s

Esta genoteca corresponde a una mezcla de ~230.000 mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium* 14028s. Cada mutante contiene una variante del transposón EZ-Tn5<T7/KAN-2> que posee un *cassette* de Kan^R y secuencias variables (“*barcodes*”) de 18 nucleótidos ubicadas en cada uno de los extremos del transposón (**Figura 3**). Estos *barcodes* permiten la identificación de cada mutante presente en la genoteca mediante secuenciación masiva de DNA. Esta genoteca fue donada a nuestro grupo por el Dr. Michael McClelland.

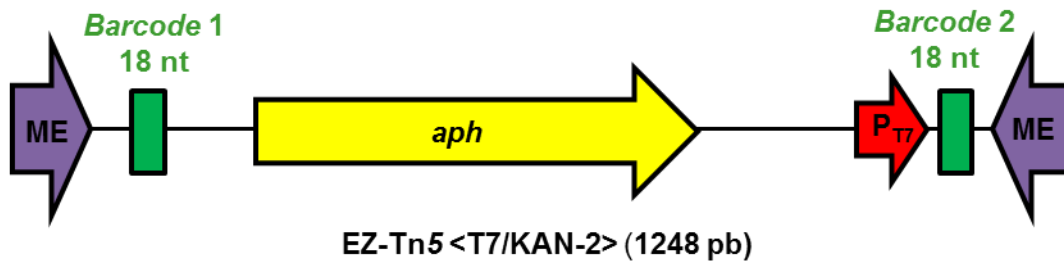


Figura 3. Esquema de la estructura de las mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium* 14028s. *aph*: aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (gen que confiere resistencia a kanamicina). P_{T7}: promotor reconocido por la RNA polimerasa del fago T7. ME: *Mosaic end*.

5.3.- Líneas celulares eucariontes

Las líneas celulares eucariontes utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.

Línea celular	Característica	Fuente
Macrófagos RAW264.7	Línea de macrófagos murinos adherentes establecida desde un tumor inducido por el Virus de la Leucemia Murina de Abelson en un ratón BALB/c	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 (DBS0302402)	Cepa silvestre axénica (<i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i>)	Dicty Stock Center

5.4.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C con agitación en caldo Luria-Bertani (LB) (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl). Cuando se requirió, el medio LB se suplementó con los siguientes antibióticos: kanamicina (Kan, 75 µg/L) o ampicilina (Amp, 100 µg/L). Para los cultivos en medio sólido, el caldo LB se suplementó con Bacto agar (15 g/L).

5.5.- Medios y condiciones de cultivo celular

5.5.1.- Macrófagos murinos RAW264.7

Inicialmente, las células almacenadas a -80°C se cultivaron en botellas de cultivo celular de 25 cm^2 que contenían medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20% y solución antibiótica/antimicótica 1X. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% (v/v) de CO_2 . Una vez que el cultivo celular alcanzó una confluencia entre un 90-100%, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X para eliminar las células no adheridas. A partir del primer traspaso, los macrófagos se mantuvieron en botellas de cultivo celular de 75 cm^2 con medio DMEM suplementado con SFB al 10% y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% (v/v) de CO_2 . Los macrófagos se subcultivaron hasta el traspaso N°25.

5.5.2.- *Dictyostelium discoideum* AX4

Las amebas se cultivaron inicialmente a 23°C sobre un césped de *Klebsiella aerogenes* crecido en placas de agar SM (10 g/L de glucosa, 10 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,9 g/L de KH_2PO_4 , 0,6 g/L de K_2HPO_4 , 20 g/L de Bacto agar, pH 6,4) y tratado con UV durante 10 min. Posteriormente, amebas obtenidas a partir de las placas de fagocitosis generadas en el agar SM se cultivaron en condiciones axénicas con agitación a 23°C en medio líquido HL5 (14 g/L de triptona, 7 g/L de extracto de levadura, 0,35 g/L de Na_2HPO_4 , 1,2 g/L de KH_2PO_4 , pH 6,3) suplementado con glucosa (14 g/L), Str (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A partir del primer subcultivo, las amebas se cultivaron en medio HL5 suplementado con glucosa y Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La concentración celular de los subcultivos se controló mediante tinción con azul de tripán y posterior recuento en cámara de Neubauer. Los subcultivos siempre se realizaron con células en fase exponencial temprana (1 a 2×10^6 células/mL). Para los ensayos de fagocitosis siempre se utilizaron células provenientes del 3^{er} al 6^{to} subcultivo.

5.6.- Partidores y oligonucleótidos

Los partidores y oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestran en la

Tabla 3.

Tabla 3. Partidores y oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Partidor / oligonucleótido	Secuencia
Para la generación de genotecas para secuenciación	
Adapter CG-end	CGAGATCGGAAGAGCp
Illumina_Index_TGACCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
PCR Primer 2.0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT
Illumina_multiplex-forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
SGD Index_7nt_2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_8	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_12	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_13	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_34	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAACGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_35	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_47	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_52	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGAAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_58	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTCCGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_60	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTAGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_63	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCATGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD Index_7nt_69	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCTGGAGACCTAAGGAGGATATTCA
SGD 5'end code_2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGAGTCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_3	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGATCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_4	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAAGTCCCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_5	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGGATCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_6	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTAGCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_7	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGAACCCCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_8	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGGCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_10	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAAGCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_11	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_12	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGAAGCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_13	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTG
SGD 5'end code_14	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGAGCTTGAAGCAGCTCCAGCCTG
Para la construcción de mutantes por reemplazo alélico	
aroA_(H1+P1)	GTTGAGTTTCATGGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCGGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
aroA_(H2+P2)	AACAGAAGACTTAGGCAGGCGTACTCATTGCGGCCAGTTGCATATGAATATCCTCCTTAG
aroA_Out3	TTTTTCATACTAATCTTCCGTGTA
aroA_Out5	GCGCGCCTATCTATAACG
arnB_(H1+P1)	GCGGCTTTCAATGGCTGAAGGAAAAATGATGTCGGACTTTGTGCAGGCTGGAGCTGCTTC
arnF_(H2+P2)	GCGCAAGCCATCATGATCTGGCGGGCAGAAAAATCAGCATCATATGAATATCCTCCTTAG
arnB_Out5	GCCAGGTATTATCGGAACGA
arnF_Out3	GCGATATCCTGTCCCTTTA
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT

Las secuencias subrayadas son complementarias a las regiones P1 y P2 del plasmidio pCLF4 (Santiviago *et al.*, 2009).

5.7.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando la genoteca de mutantes SGD-K de *S. Typhimurium*

El día previo a la infección, se creció una alícuota de la genoteca SGD-K en 10 mL de caldo LB suplementado con Kan a 37°C con agitación durante toda la noche. En paralelo, se sembraron 2×10^6 macrófagos RAW264.7 en una placa de cultivo celular de 6 pocillos que contenía medio DMEM suplementado con 10% de SFB y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% v/v de CO₂ durante toda la noche.

Al día siguiente, las bacterias se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a $3.420 \times g$ (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C. El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió en medio DMEM (muestra *input*). Para la infección, $\sim 4 \times 10^6$ células se co-incubaron con una alícuota del cultivo de la genoteca SGD-K durante 45 min a 37°C, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10 bacterias/célula. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron en medio DMEM suplementado con gentamicina (Gen, 200 µg/mL) durante 1 h a 37°C, para eliminar las bacterias extracelulares. Las células infectadas se lavaron nuevamente con PBS 1X (3 veces) y se mantuvieron en DMEM suplementado con Gen 50 µg/mL a 37°C hasta 6 y 20 h post-infección. Para recuperar las bacterias intracelulares a distintos tiempos de infección (0, 6 y 20 h), las células infectadas se lavaron 3 veces con PBS 1X y se lisaron con 1 mL de DOC al 0,5%. Finalmente, se determinaron las UFC correspondientes a las bacterias usadas para infectar (muestra *input*) y a las bacterias intracelulares recuperadas (muestras *output*) mediante dilución seriada en PBS 1X y posterior siembra en agar LB. En paralelo, se determinó el número de células viables en cada tiempo de infección mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer. Adicionalmente, alícuotas de las muestras *input* y *output* (0, 6 y 20 h) se centrifugaron a $3.420 \times g$ (6.000 rpm) durante 5 min y se lavaron con PBS 1X para eliminar el exceso de detergente. El sedimento obtenido de cada muestra se creció en caldo LB durante 12 h a 37°C para aumentar la biomasa bacteriana. Cada cultivo se centrifugó a $3.420 \times g$ (6.000 rpm) durante 5 min y el

sedimento obtenido se guardó a -20°C para su posterior tratamiento. En la **Figura 4** se muestra un esquema del ensayo descrito.

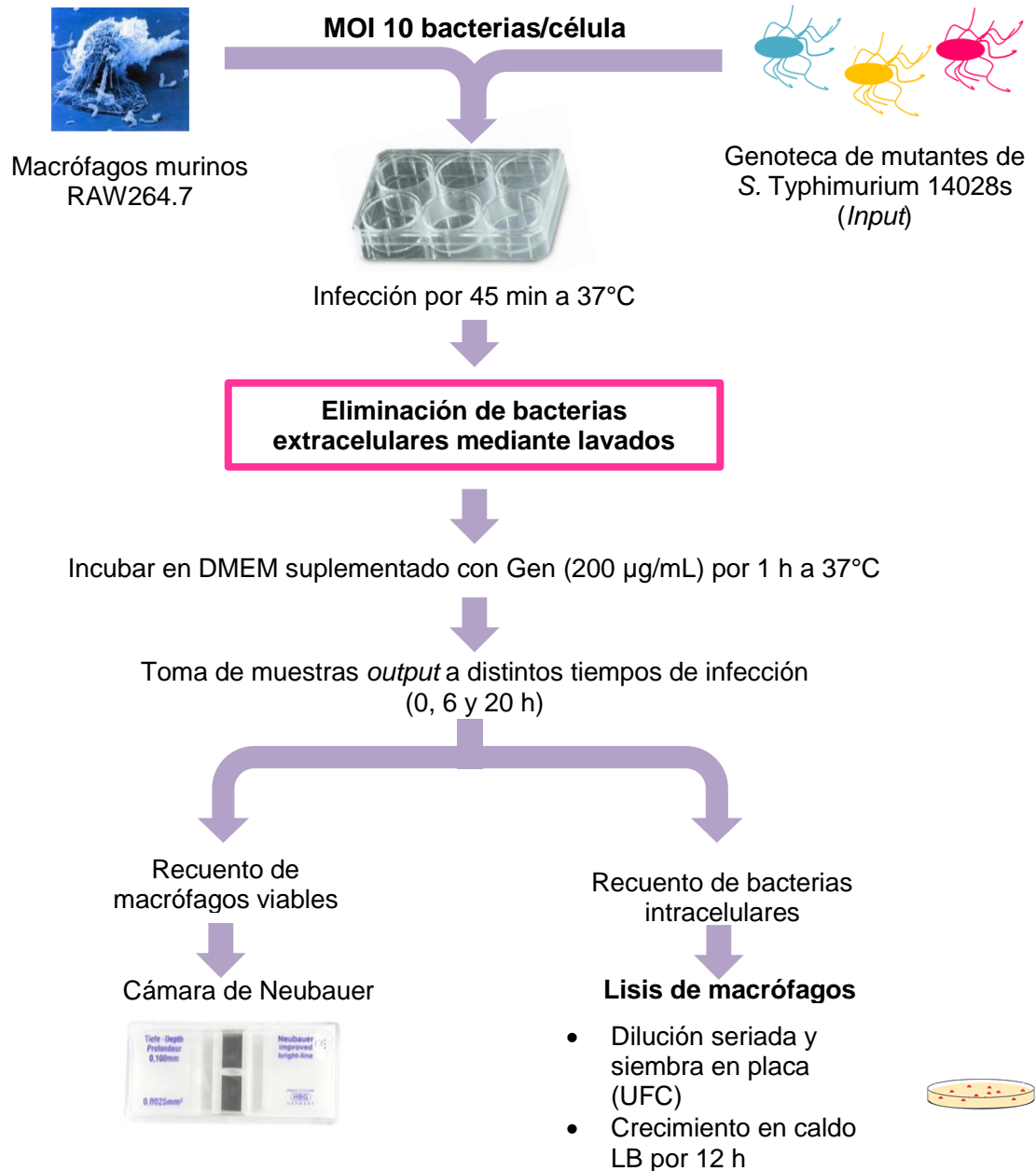


Figura 4. Esquema del ensayo de protección a gentamicina usando macrófagos murinos RAW264.7 infectados con cepas de *S. Typhimurium*.

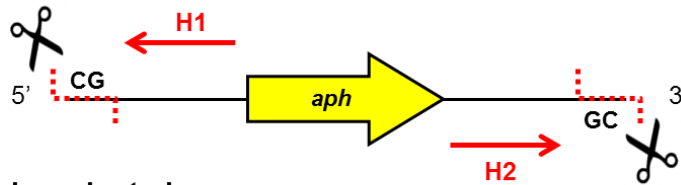
5.8.- Generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina*

En nuestro laboratorio se diseñó un protocolo para identificar cada una de las mutantes de *S. Typhimurium* presentes en las distintas poblaciones analizadas (muestras *input* y *output*) mediante secuenciación masiva de DNA usando el sistema *MiSeq* de *Illumina* (**Figura 5**). Mediante este protocolo, se amplificaron las regiones adyacentes (ya sea río arriba o río abajo) al sitio de inserción del *cassette* de Kan^R presente en cada mutante de la genoteca SGD-K. El análisis posterior de los datos de secuenciación permitió identificar las mutantes bajo selección negativa en macrófagos murinos. A continuación se detallan los distintos pasos que conforman el protocolo mencionado.

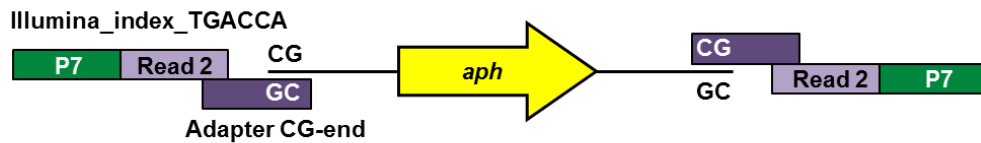
5.8.1.- Extracción de DNA genómico

Los sedimentos bacterianos obtenidos a partir de cada una de las muestras *input* y *output* se resuspendieron en 1mL de PBS 1X. Se utilizaron 100 µL de cada suspensión bacteriana para extraer DNA genómico (gDNA) usando el sistema comercial “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” de acuerdo al protocolo del fabricante. Cada muestra de gDNA se eluyó en 100 µL de H₂O libre de nucleasas y luego se midió su concentración y pureza (A_{260}/A_{280}) usando un equipo Nanodrop. Además, se evaluó la integridad del gDNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min. Las muestras de gDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

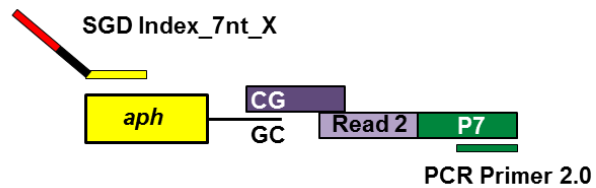
Digestión enzimática



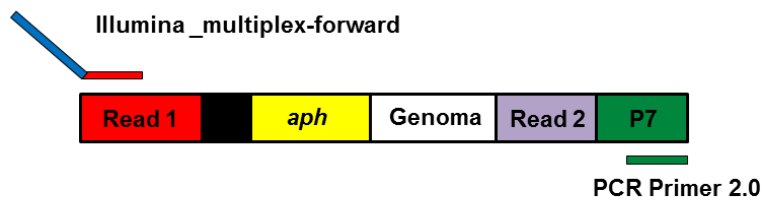
Ligación de oligonucleótidos adaptadores



Amplificación: 1er PCR



Amplificación: 2da PCR



Producto final

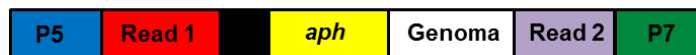


Figura 5. Esquema del protocolo usado para la generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante *MiSeq* de *Illumina*. El gDNA de cada mezcla de mutantes recuperadas a los distintos tiempos de infección se digirió con la enzima de restricción *Acil*. Luego, a los fragmentos generados se ligaron los adaptadores “Adapter CG-end” e “Illumina_index_TGACCA” con la enzima T4 DNA ligasa. Posteriormente, se amplificaron los fragmentos para enriquecer las muestras en las regiones de interés utilizando partidores que incorporaron las secuencias necesarias para el proceso de secuenciación y secuencias específicas (“*barcodes*”) que permiten diferenciar cada muestra. Finalmente, los fragmentos generados se secuenciaron mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina*.

5.8.2.- Digestión con enzima de restricción

Alícuotas que contenían 2 µg de gDNA de cada muestra se digirieron con la enzima de restricción *Acil* durante 2 h a 37°C de acuerdo al siguiente protocolo:

Reacción de Digestión (60 µL)		
Reactivos	Volúmenes (µL)	Concentración
gDNA (2 µg)	X	-
Solución amortiguadora <i>CutSmart</i> 10X	6	1X
<i>Acil</i> (10 U/µL)	0,5	5 U/reacción
H ₂ O	53,5 – X	-

5.8.3.- Ligación de oligonucleótidos adaptadores

Se ligaron los oligonucleótidos adaptadores “Illumina_index_TGACCA” y “Adapter CG-end” (**Tabla 3**) al gDNA digerido correspondiente a cada una de las muestras utilizando la enzima T4 DNA ligasa de acuerdo al siguiente protocolo:

Reacción de Ligación (40 µL)		
Reactivos	Volúmenes (µL)	Concentración
gDNA digerido (1 µg)	30	-
ATP (10 mM)	4	1 mM
Adapter CG-end (10 µM)	2	0,5 µM
Illumina_index_TGACCA (10 µM)	2	0,5 µM
T4 DNA ligasa (200 U/µL)	1	200 U/reacción
H ₂ O	1	-

La reacción de ligación se realizó en varios pasos secuenciales, usando el siguiente programa:

Programa de ligación	
Temperatura	Tiempo
25°C	90 min
10°C	90 min
16°C	∞

Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 95°C durante 5 min para inactivar las enzimas presentes en la mezcla de reacción. El DNA ligado fue purificado con el sistema comercial “*QIAquick PCR Product Purification*”, según el

protocolo del fabricante. Se obtuvieron 50 μL de DNA ligado purificado de cada muestra. Luego, se analizó una alícuota de 3 μL del DNA ligado purificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min. El remanente de cada muestra de DNA se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

5.8.4.- Amplificación de fragmentos mediante PCR

Se realizó un paso de amplificación para aumentar la abundancia de fragmentos de interés, al mismo tiempo de agregar secuencias que permitan la unión del DNA a la placa de secuenciación y secuencias específicas (“*barcodes*”) para poder diferenciar las distintas muestras. De esta forma, se realizaron 2 reacciones de PCR sucesivas para generar la genoteca para secuenciación. En la primera reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

Protocolo de la primera amplificación por PCR (50 μL)		
Reactivos	Volúmenes (μL)	Concentración
Solución amortiguadora 10X	5	1X
MgCl_2 (25 mM)	3	1,5 mM
Partidor “PCR primer 2.0” (5 μM)	4	0,4 μM
Partidor “SGD Index_7nt_X” o “SGD 5’end code_X” (5 μM)	4	0,4 μM
dNTPs 10X (2 mM c/u)	5	0,2 mM
DNA ligado	12	-
H_2O libre de nucleasas	16,5	-
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/ μL)	0,5	2,5 U/reacción

El programa de la primera amplificación por PCR fue el siguiente:

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 min	1
95°C	30 seg	10
60°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	2 min	1
20°C	∞	-

El partidador “PCR primer 2.0” hibrida con la secuencia del adaptador ligado y los partidores “SGD Index_7nt_X” o “SGD 5’end code_X” hibridan con un segmento del *cassette* de Kan^R presente en cada mutante en el extremo 3’ y 5’, respectivamente. Ambos partidores contienen una secuencia variable denominada “*in-line barcode*” que permite identificar cada muestra. Con el propósito de no alterar la abundancia relativa de las moléculas de DNA generadas durante la reacción de PCR, se utilizaron sólo 10 ciclos de amplificación. Los productos de PCR generados se analizaron en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V durante 40 min. Posteriormente, las muestras se purificaron mediante el sistema comercial “*QIAquick PCR Product Purification Kit*”, según el protocolo del fabricante. Los productos de la primera amplificación se utilizaron como templados para una segunda amplificación, en la que se utilizaron los siguientes reactivos:

Protocolo de la segunda amplificación por PCR (50 µL)		
Reactivos Segunda PCR	Volúmenes (µL)	Concentración
Solución amortiguadora 10X	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
Partidor “PCR primer 2.0” (5 µM)	4	0,4 µM
Partidor “Illumina_multiplex-forward” (2,5 µM)	8	0,4 µM
dNTPs 10X (2 mM c/u)	5	0,2 µM
Producto de la primera amplificación	1	-
H ₂ O libre de nucleasas	23,5	-
Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,5	2,5 U/reacción

El programa de la segunda amplificación por PCR fue el siguiente:

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 min	1
95°C	30 seg	13
60°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	2 min	1
20°C	∞	-

El partidador “Illumina_multiplex-forward” hibrida con la región 5’ de los partidores “SGD Index_7nt_X” o “SGD 5’end code_X”, agregando secuencias necesarias para la secuenciación. En esta amplificación se realizaron 13 ciclos, completando un total de 23 ciclos totales de amplificación.

5.8.5.- Electroforesis y purificación de DNA en geles de agarosa

Inicialmente, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X teñidos con GelRed. La electroforesis se realizó a 100 V durante 40 min. A partir de los geles se purificaron los productos de PCR seleccionando un rango de tamaño entre ~100 pb y ~800 pb. Esto se realizó para eliminar una banda de ~90 pb generada por amplificación entre los partidores. La purificación se realizó usando el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*”, según el protocolo del fabricante. Para verificar la eliminación de la banda mencionada, se analizaron 3 µL de producto de PCR purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X. La electroforesis se realizó a 100 V durante 40 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su secuenciación.

5.8.6.- Secuenciación masiva de DNA mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina*

El DNA amplificado y purificado desde los geles se cuantificó mediante un método fluorimétrico usando el sistema comercial “*Qubit*”. Además, se determinó la distribución de los fragmentos en cada muestra mediante electroforesis capilar utilizando el sistema “*Fragment Analyzer*”. Con estos datos, se calculó la molaridad de cada muestra y se realizó una mezcla equimolar de todas las muestras *input* y *output* (0, 6 y 20 h). Esta genoteca de fragmentos se secuenció por los extremos 3’ (región H1) y 5’ (región H2) utilizando el sistema comercial “*MiSeq Reagent Kit v3*” durante 75 ciclos en un equipo *MiSeq* de *Illumina*. La secuenciación se realizó gracias a una colaboración con el grupo del Dr. Víctor Martínez, académico del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

5.8.7.- Expresión de resultados y análisis de datos

Los datos de la secuenciación masiva de las genotecas generadas fueron analizados considerando tres réplicas biológicas para cada condición experimental. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas en el genoma de *S. Typhimurium* 14028s y analizadas mediante herramientas computacionales desarrolladas por el equipo del Dr. Juan Ugalde, quien a la fecha de este estudio se desempeñaba como académico del Centro de Genética y Genómica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo.

5.9.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando una genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium*

Estos ensayos se realizaron usando el protocolo de infección descrito en la sección 5.7, con algunas modificaciones. Se sembraron $\sim 4 \times 10^6$ macrófagos en botellas de cultivo celular de 75 cm² que contenían medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Las botellas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% v/v de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 90-100%. Cada cultivo confluyente contenía $\sim 1 \times 10^7$ células por botella y se consideraron 2 botellas por cada tiempo de infección. Los macrófagos de cada botella se infectaron con una alícuota de la genoteca de mutantes por transposición usando una MOI de 10 bacterias/célula. Luego de 45 min de infección, cada botella se lavó tres veces con 5 mL de PBS 1X y se incubó con 10 mL de medio DMEM suplementado con Gen (200 µg/mL) durante 1 h a 37°C para eliminar las bacterias extracelulares. Luego, las células infectadas se lavaron tres veces con 5 mL de PBS 1X y se mantuvieron con 10 mL de DMEM suplementado con Gen (50 µg/mL) a 37°C durante 6 y 20 h. Las células infectadas del T0 provenientes de 2 botellas se desprendieron por acción mecánica en 5 mL de medio DMEM. Una alícuota de la suspensión celular se utilizó para determinar el número de células viables mediante tinción con azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer. El resto de células infectadas se centrifugó a $3.420 \times g$ (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C y el sedimento obtenido se lisó con 1 mL de DOC 0,5%. Se utilizaron alícuotas de 100 µL del lisado para determinar las UFC correspondientes a las bacterias

intracelulares mediante dilución seriada en PBS 1X y posterior siembra en placa de agar LB. Los 900 μ L restantes del lisado se centrifugaron a 3.420 x g (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C y el sedimento se lavó con 1 mL de PBS 1X para eliminar el exceso de detergente. Las bacterias se centrifugaron nuevamente, el sedimento se resuspendió en 20 mL de caldo LB y se incubó a 37°C con agitación durante 8-12 h. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 3.420 x g (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C y el sedimento se mantuvo a -20°C hasta su uso posterior.

En los ensayos de infecciones sucesivas se utilizó como *input* una alícuota de bacterias intracelulares recuperadas luego de 20 h de infección, obtenidas a partir de un ensayo previo. Cada ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

5.10.- Secuenciación masiva de DNA de la genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium* 14028s

Inicialmente, se extrajo gDNA de cada muestra a partir de 100 μ L de suspensión bacteriana como se describe en la sección 5.8.1. Se midió la concentración y pureza (A_{260}/A_{280}) del gDNA usando un equipo *Nanodrop* y se evaluó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X. Las muestras de gDNA se enviaron al laboratorio del Dr. Michael McClelland en la Universidad de California, Irvine CA, USA, para su secuenciación. Para esto, las muestras de gDNA fueron usadas para construir genotecas para secuenciación masiva de DNA. Mediante una estrategia basada en PCR, se amplificaron las secuencias variables de 18 nucleótidos (*barcodes*) presentes en cada brazo del transposón y se agregaron a los productos las secuencias requeridas para la secuenciación (**Figura 6**). Finalmente, los productos de PCR fueron secuenciados utilizando un equipo *HiSeq* de *Illumina*.

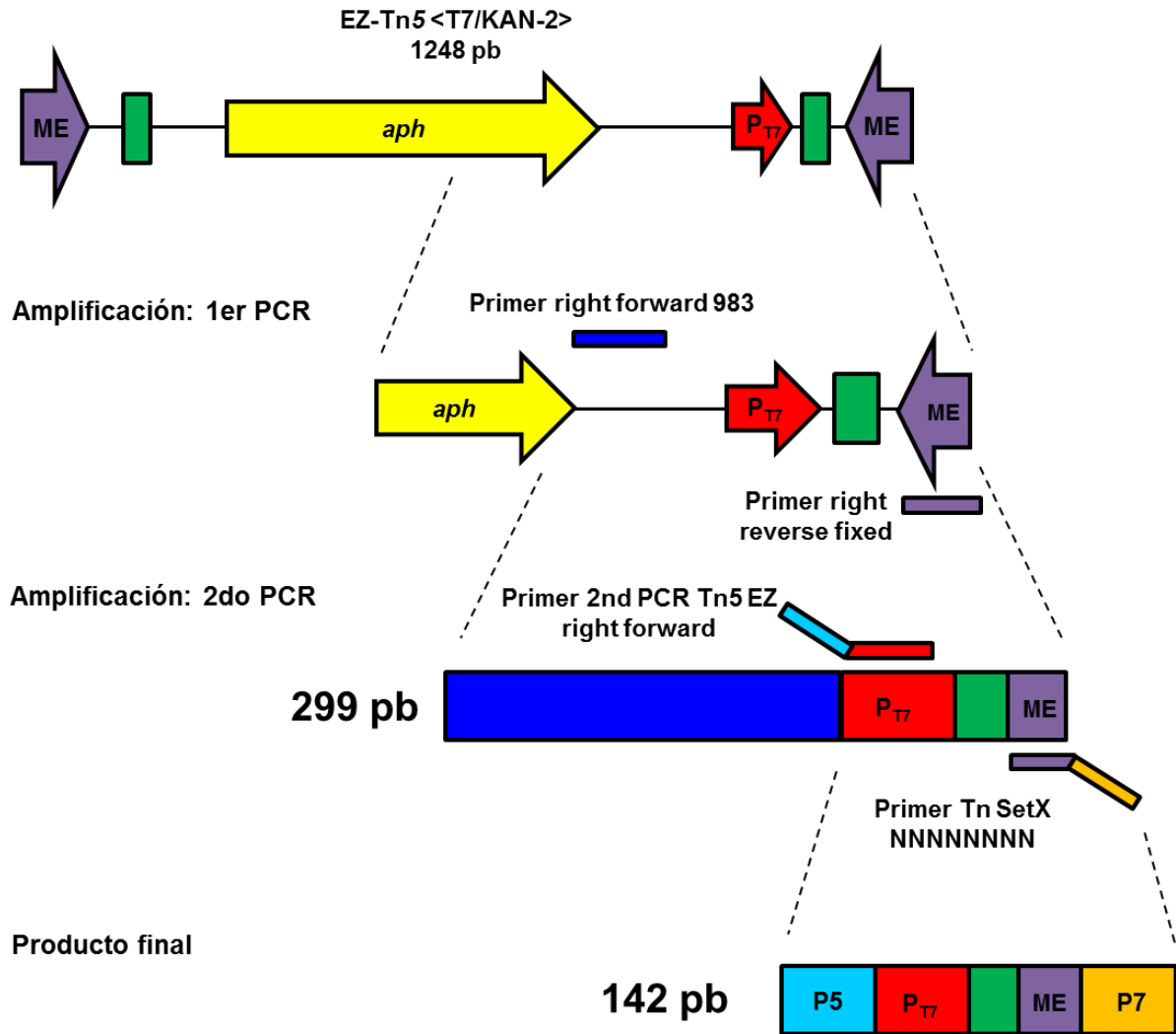


Figura 6. Esquema de amplificación usado para la generación de genotecas para secuenciación masiva de DNA mediante *HiSeq* de *Illumina*. El gDNA de cada mezcla de mutantes por inserción al azar de un transposón se amplificó para enriquecer las muestras en las regiones de interés (“*barcodes*”, cuadro verde) utilizando partidores que incorporaron las secuencias necesarias para el proceso de secuenciación que permiten diferenciar cada muestra. Finalmente, los fragmentos generados se secuenciaron mediante el sistema *HiSeq* de *Illumina*.

5.10.1.- Análisis de los datos de la secuenciación

La secuenciación de cada región variable (*barcodes*) permitió la identificación de cada mutante presente en las poblaciones de las distintas muestras analizadas. Las secuencias correspondientes a cada mutante se normalizaron por el número total de secuencias obtenidas en cada tiempo de infección, lo que permitió calcular la abundancia relativa de cada mutante. Luego, a partir de la abundancia relativa se

determinó la razón T_6/T_0 y T_{20}/T_0 para cada mutante en cada réplica realizada y se calculó el correspondiente valor de $\text{Log}_2(T_6/T_0)$ y $\text{Log}_2(T_{20}/T_0)$. A partir de los valores de las 3 réplicas biológicas, se calculó el promedio del $\text{Log}_2(T_6/T_0)$ y $\text{Log}_2(T_{20}/T_0)$. Además, se usó la prueba estadística t de Student de dos colas para comparar las diferencias entre las 3 réplicas de las lecturas normalizadas del T_6 o T_{20} y el promedio de las lecturas normalizadas del T_0 para cada mutante. Posteriormente, se escogieron tres criterios para definir si una mutante se encontraba bajo selección negativa (es decir, que disminuía su abundancia relativa en la población de mutantes a lo largo de la infección). Estos criterios fueron: que el valor de $\text{Log}_2(T_6/T_0)$ o $\text{Log}_2(T_{20}/T_0)$ fuera ≤ -1 . Es decir, que la abundancia relativa de una mutante disminuya al menos a la mitad al comparar el T_6 con el T_0 ; (ii) que el valor de $\text{Log}_2(T_6/T_0)$ o $\text{Log}_2(T_{20}/T_0)$ tuviera significancia estadística ($P \leq 0,05$); y (iii) que los genes identificados mediante el análisis de los datos presentaran al menos 3 mutantes (inserciones) independientes que cumplan los criterios anteriores.

Por otra parte, a cada gen identificado se le asignó una categoría funcional asociada a la proteína que codifican de acuerdo a un análisis de *Clusters of Orthologous Groups* (COGs) (**Tatusov et al., 2000**). La asignación se realizó a partir de una base de datos del laboratorio generada a partir de la secuencia de *S. Typhimurium* LT2, donde cada gen tenía su propia categoría COG. Para aquellos genes ausentes en la base de datos mencionada, se buscó manualmente una categoría COG en la base de datos disponible en la plataforma <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/COG2014/static/lists/listSalent.html>.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo de los datos obtenidos en esta tesis con los datos generados en la Memoria de Título de Bioquímico de Bayron Labra (2018), donde se utilizó la misma genoteca de mutantes de *S. Typhimurium* 14028s por inserción del transposón derivado de Tn5 en el modelo de la ameba *Dictyostelium discoideum*. Los datos de esta Memoria de Título se reanalizaron según los criterios de selección mencionados anteriormente y ambas bases de datos se alinearon usando el programa Access 2010 (Microsoft) de acuerdo al descriptor “*Locus_Tag*” asignado a cada gen. De esta manera, se logró identificar un conjunto

común de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en ambos modelos de infección.

5.11.- Construcción de mutantes de *S. Typhimurium* 14028s mediante el método de *Red-swap*

Las mutantes derivadas de *S. Typhimurium* 14028s con deleciones de regiones genómicas específicas se construyeron mediante el método de intercambio alélico por recombinación de productos de PCR dependiente de la recombinasa Red del fago λ (*Red-swap*) descrito por Datsenko y Wanner (**Datsenko and Wanner, 2000**), considerando ciertas modificaciones (**Santiviago et al., 2009**).

5.11.1.- Amplificación del *cassette* de resistencia a antibiótico mediante PCR

Para este propósito, se diseñaron partidores de 60 nucleótidos (partidores “X_H1+P1” y “X_H2+P2” en la **Tabla 3**) cuyos extremos 5’ contienen 40 nucleótidos idénticos a la región que flanquea al gen o región genómica que se desea mutar. Por su parte, el extremo 3’ de los partidores posee 20 nucleótidos que hibridan con los extremos 5’ y 3’ del *cassette* de resistencia a antibiótico que contiene el gen *aph* (que codifica la enzima aminoglicósido 3’ fosfotransferasa que otorga resistencia a Kan), flanqueado por los sitios FRT (*Flp recombinase target sequence*) dentro del plasmidio pCLF4 (GenBank EU629214). Con estos partidores, se amplificó la región del *cassette* de resistencia a antibiótico del plasmidio pCLF4 siguiendo el protocolo señalado a continuación:

Protocolo de amplificación por PCR (50 μ L)		
Reactivos	Volúmenes (μ L)	Concentración
Solución amortiguadora 10X	5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPs 50X (10 mM cada uno)	1	0,2 mM
Partidor “X_H1+P1” 10 μ M	1	0,2 μ M
Partidor “X_H2+P2” 10 μ M	1	0,2 μ M
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,3	1,5 U/reacción
DNA (pCLF4)	0,5	-
H ₂ O libre de nucleasas	39,7	-

El programa de amplificación fue el siguiente:

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	30 seg	30
55°C	30 seg	
72°C	2 min	
72°C	2 min	1
4°C	∞	-

El fragmento amplificado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X teñido con GelRed. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez verificado el peso molecular del amplicón (~1.500 pb), se purificó usando el sistema comercial “QIAquick PCR Product Purification Kit” (Qiagen), según el protocolo del fabricante.

5.11.2.- Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación con DNA plasmidial

Para obtener bacterias electrocompetentes, se cultivó *S. Typhimurium* 14028s en caldo LB a 37°C con agitación durante toda la noche. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1:50 en el mismo medio y se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4-0,6. Luego, las bacterias se centrifugaron a 3.420 x *g* (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento obtenido se resuspendió en 30 mL de glicerol 15% estéril y frío. La suspensión bacteriana se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 30 mL de glicerol 15% estéril y frío. Este proceso de centrifugación y lavados se repitió 3 veces. Finalmente, el sedimento se resuspendió en ~500 μ L de glicerol 15% estéril y frío.

En esta tesis, la cepa *S. Typhimurium* 14028s se transformó con el plasmidio pKD46, que tiene clonados los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control del promotor P_{araBAD} , inducible por L-arabinosa. Además, este plasmidio otorga resistencia a Amp que permite

seleccionar las colonias transformadas. Para obtener células transformadas, se mezclaron 95 μL de bacterias electrocompetentes con 1 μL del plasmidio pKD46 purificado y se electroporó utilizando un equipo “*E. coli Pulser*” (BioRad) a un voltaje de 1,8 kV en cubetas con 0,1 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después de electroporar, se agregaron 900 μL de caldo LB en la cubeta y se incubó a 37°C durante 1 h. Las bacterias se sembraron en placas de agar LB suplementado con Amp y se incubaron a 30°C durante toda la noche.

5.11.3.- Mutagénesis por intercambio alélico con productos de PCR

Colonias de *S. Typhimurium* 14028s transformada con pKD46 se crecieron en caldo LB suplementado con Amp a 30°C con agitación durante toda la noche. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1:50 en el mismo medio y se cultivó hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6. En este punto, se agregó L-arabinosa al cultivo hasta alcanzar una concentración final de 10 mM para inducir la expresión de la recombinasa Red. Luego de 1 h de incubación a 30°C con agitación, se prepararon bacterias electrocompetentes como se describió en la sección 5.11.2.

Para la obtención de una mutante en particular, se mezclaron 95 μL de bacterias electrocompetentes con 20 μL de producto de PCR previamente dializado en membrana de nitrocelulosa. Luego, las bacterias se electroporaron utilizando un equipo “*E. coli Pulser*” (BioRad) a un voltaje de 1,8 kV en cubetas con 0,1 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después de electroporar, se agregaron 900 μL de caldo LB en la cubeta y se incubó a 37°C durante 1 h. Las bacterias se sembraron en placas de agar LB suplementado con Kan y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.11.4.- Verificación de las mutantes obtenidas

Para verificar la correcta inserción del *cassette* de resistencia a antibiótico en el cromosoma durante la mutagénesis, se realizó un PCR de colonias utilizando partidores que hibridan con regiones externas al sitio de inserción. Como DNA templado, se utilizó una colonia resuspendida en 100 μL de agua estéril libre de nucleasas. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

Protocolo de amplificación por PCR (20 μ L)		
Reactivos	Volúmenes (μ L)	Concentración
Solución amortiguadora 5X	4	1X
MgCl ₂ (25mM)	1,6	2 mM
dNTPs 50X (10 mM cada uno)	0,4	0,2 mM
Partidor "X_Out3" (10 μ M)	0,4	0,2 μ M
Partidor "X_Out5" (10 μ M)	0,4	0,2 μ M
GoTaq DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,2	1 U/reacción
DNA	2	-
H ₂ O libre de nucleasas	11	-

El programa de la reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Programa de PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	30 seg	30
55°C	30 seg	
72°C	2 min	
72°C	2 min	1
4°C	∞	-

El fragmento amplificado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% en solución amortiguadora TAE 1X teñido con GelRed. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min.

5.12.- Transducción de alelos mutantes en *S. Typhimurium* 14028s

Se utilizó el bacteriófago P22 HT105-1 *int-201* para movilizar el alelo mutante presente en cada mutante generada por el método de *Red-swap* a un *background* genético limpio mediante transducción generalizada (Maloy, 1990), como se describe a continuación.

5.12.1.- Preparación del lisado del fago P22

Se creció la cepa mutante de *S. Typhimurium* 14028s en caldo LB suplementado con Kan a 37°C con agitación durante toda la noche. A partir de este cultivo se tomaron 200 μ L y se mezclaron con 1 mL de *P22 broth* (0,1 mL de fago P22 HT *int* en 2 mL medio mínimo E 50X esterilizado con cloroformo suplementado con 1 mL de glucosa al 20%). La mezcla se incubó a 37°C con agitación durante toda

la noche. Al lisado obtenido se le agregaron 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente usando un Vortex y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 50 µL de cloroformo. Este lisado se almacenó a 4°C para su uso posterior.

5.12.2.- Transducción

Se creció la cepa *S. Typhimurium* 14028s en caldo LB a 37°C con agitación durante toda la noche. Para la transducción, se mezclaron 200 µL de este cultivo con 5 µL de lisado obtenido a partir de una mutante particular y se incubó durante 30 min a 37°C sin agitación. De igual manera, se realizaron los controles negativos para el protocolo de transducción: un control sin bacteriófago (100 µL de cultivo de la cepa receptora sin lisado) y un control sin bacteria (100 µL de lisado). Luego de la incubación, se sembraron 100 µL de la transducción y sus controles en placas de agar LB suplementado con Kan y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.12.3.- Selección de transductantes

Para obtener una cepa sin contaminación con partículas del fago P22, las bacterias transductantes seleccionadas se aislaron reiteradamente en placas de agar EBU (agar LB suplementado con K₂HPO₄ 2,5 g/L, azul de Evans 12,5 mg/L, uranina 25 mg/L y glucosa 2 g/L) hasta obtener colonias sin evidencia de lisis producto del fago P22 (colonias blancas). Para confirmar la ausencia de fago P22 en las colonias aisladas, se determinó su sensibilidad al bacteriófago lítico P22 H5 en un ensayo de *cross streaking*. Esto se realizó trazando una línea a lo largo de una placa de agar EBU con 50 µL de lisado del fago P22 H5. Luego que el lisado se secó sobre la superficie del agar, se sembraron las transductantes a analizar de manera perpendicular al fago sembrado y se incubó a 37°C toda la noche. Finalmente, se seleccionaron las transductantes cuyo crecimiento se vio interrumpido en presencia del fago P22 H5.

5.13.- Ensayos de competencia *in vitro* entre cepas de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7 y *D. discoideum* AX4

5.13.1.- Condiciones generales

El día anterior a los ensayos, la cepa silvestre y las cepas mutantes de *S. Typhimurium* se crecieron en caldo LB y LB suplementado con Kan, respectivamente, y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Previo a la infección, las bacterias crecidas se centrifugaron a 3.420 x g (6.000 rpm) durante 5 min a 4°C y se lavaron 2 veces con PBS 1X o solución amortiguadora Soerensen 1X, según correspondiera. Tanto los macrófagos murinos como las amebas se infectaron con una mezcla 1:1 de cultivos de la cepa silvestre y de una mutante particular de *S. Typhimurium*.

5.13.2.- Ensayo de competencia *in vitro* en macrófagos RAW264.7

Los ensayos se realizaron de manera similar al ensayo de protección a gentamicina descrito en la sección 5.7, considerando algunas modificaciones. Se infectaron $\sim 2 \times 10^5$ células crecidas en placas de 48 pocillos con 100 μ L de la mezcla 1:1 de la cepa silvestre y la mutante a evaluar, usando una MOI de 50 bacterias/célula. Luego de 45 min de infección, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 200 μ L de DMEM suplementado con Gen (200 μ g/mL) durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron nuevamente con PBS 1X y se lisaron con 100 μ L de DOC 0,5% para recuperar las bacterias intracelulares a distintos tiempos de infección (0, 6 y 20 h). A tiempos largos de infección, las células infectadas se mantuvieron en 200 μ L de DMEM suplementado con Gen (20 μ g/mL) a 37°C durante 6 o 20 h. Finalmente, se determinaron las UFC correspondientes a las bacterias usadas para infectar (muestras *input*) y a las bacterias intracelulares recuperadas (muestras *output*) mediante dilución seriada en PBS 1X y posterior siembra en placa de agar LB (bacterias totales) y agar LB suplementado con Kan (cepas mutantes). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. En paralelo, se determinó el número de células viables en cada tiempo de infección mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer.

5.13.3.- Ensayo de competencia *in vitro* en *D. discoideum*

Previo a la infección, las bacterias lavadas con solución amortiguadora Soerensen 1X se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial del cultivo. Por otra parte, las amebas se centrifugaron a 200 x *g* durante 5 min a 23°C y se lavaron 2 veces con solución amortiguadora Soerensen 1X. El sedimento de amebas se resuspendió en la misma solución amortiguadora en un 1/5 del volumen inicial del cultivo.

Para la infección, $\sim 2 \times 10^6$ amebas se co-incubaron con la mezcla 1:1 de la cepa silvestre y la mutante a evaluar, usando una MOI de 100 bacterias/célula. Luego de 1 h de co-incubación a 23°C con agitación, las células se centrifugaron a 200 x *g* durante 5 min a 23°C y se lavaron 3 veces con solución amortiguadora Soerensen 1X con el fin de eliminar las bacterias extracelulares. El sedimento se resuspendió en 10 mL de solución amortiguadora Soerensen y se dejó incubando a 23°C con agitación hasta los distintos tiempos de infección (0, 3 y 6 h). Para obtener el recuento de bacterias, a 100 μ L de la suspensión de células infectadas se le agregaron 100 μ L de solución amortiguadora Soerensen 1X suplementado con Gen (10 μ g/mL) y se centrifugó a 200 x *g* durante 5 min a 23°C. El propósito de esta etapa fue eliminar las bacterias extracelulares remanentes. Luego, se descartaron 180 μ L del sobrenadante y el sedimento se homogeneizó con 80 μ L de solución Soerensen 1X. Las células se centrifugaron a 200 x *g* durante 5 min a 23°C, se eliminaron 80 μ L de sobrenadante y los 20 μ L restantes se lisaron agregando 80 μ L de Triton X-100 al 0,2% para liberar las bacterias intracelulares. Se realizó una dilución seriada en PBS 1X de los lisados obtenidos en cada tiempo y se sembraron alícuotas de estas diluciones en placas de agar LB (bacterias totales) y agar LB suplementado con Kan (cepas mutantes). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. En paralelo, se determinó el número de amebas viables en cada tiempo mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer.

5.13.4.- Expresión de resultados y análisis estadístico

Las UFC de cada mutante se expresaron como valores relativos a las UFC de la cepa silvestre en cada tiempo de infección (0, 6 y 20 h en macrófagos y 0, 3 y 6 h en la ameba). De esta manera, se calculó el Índice de Competencia (IC) para la internalización y la supervivencia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{[UCF_{mutante} / UFC_{silvestre}]_{Final}}{[UCF_{mutante} / UFC_{silvestre}]_{Inicial}}$$

El IC para la internalización se calculó considerando como razón de UFC inicial a las bacterias presentes en el inóculo y como razón de UFC final a las bacterias intracelulares recuperadas al tiempo 0 h. Para el IC de la supervivencia intracelular se consideró como razón de UFC inicial a las bacterias recuperadas al tiempo 0 h y como razón final a las bacterias intracelulares recuperadas a los tiempos 3, 6 y 20 h post-infección.

Finalmente, los valores de IC fueron expresados como logaritmo en base 10 (Log_{10}) y se interpretaron de acuerdo a los siguientes criterios:

- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) < 0$, indica que la cepa mutante sobrevive/invade menos que la cepa silvestre.
- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) = 0$, indica que la cepa mutante se comporta como la cepa silvestre.
- $\text{Log}_{10}(\text{IC}) > 0$, indica que la cepa mutante sobrevive/invade más que la cepa silvestre.

La significancia estadística se determinó a partir de 3 o más réplicas biológicas utilizando la prueba estadística *t* de Student de dos colas.

6.- RESULTADOS

6.1.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando la genoteca SGD-K de *S. Typhimurium*

Se realizaron cinco ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando la genoteca de mutantes SGD-K de *S. Typhimurium* 14028s, como se describió en la sección 5.7 de Materiales y Métodos. Se seleccionaron las muestras correspondientes a tres ensayos que cumplieran con los siguientes criterios: (i) presentar una MOI cercana a 10 bacterias/célula y (ii) que en cada ensayo la cobertura representara al menos 10 veces la complejidad de la genoteca (~3700 mutantes). La cobertura se define como el número de veces que se encuentra representado el número total de mutantes distintas que componen la genoteca (complejidad) en la población final de bacterias recuperadas. Es decir, la cobertura corresponde a las UFC totales finales de cada tiempo dividido por las ~3.700 mutantes en la genoteca. Este criterio se estableció con el fin de definir la pérdida al azar de mutantes producto de un “cuello de botella biológico” durante la infección. En la **Tabla 4** se muestran los valores de MOI y cobertura de las muestras obtenidas a distintos tiempos de infección. En todos los ensayos se lograron valores de cobertura superiores a 100X, indicando que cada mutante de la genoteca estaría representada al menos 100 veces en la población total de bacterias recuperada en cada tiempo de infección.

En cada uno de los ensayos se infectaron $\sim 4 \times 10^6$ células con una alícuota de la genoteca de mutantes SGD-K. A los distintos tiempos de infección (0, 6 y 20 h) se determinaron las bacterias intracelulares totales (**Figura 7A**) y el recuento de macrófagos viables de cada muestra (**Figura 7B**). Como se observa en la **Figura 7A**, la población bacteriana total obtenida en las tres réplicas biológicas fluctuó entre 4×10^5 y 5×10^6 UFC. Por otra parte, la población de macrófagos viables totales se mantuvo constante durante todos los tiempos de infección (**Figura 7B**), indicando que las mutantes de *S. Typhimurium* presentes en la genoteca SGD-K no causaron la muerte de los macrófagos en los distintos ensayos realizados.

Tabla 4. Datos de infecciones mediante ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 con la genoteca de mutantes SGD-K de *S. Typhimurium*.

Réplica	MOI	Tiempo (h)	Cobertura
1	4	0	342X
		6	712X
		20	1261X
2	5	0	288X
		6	149X
		20	126X
3	70	0	297X
		6	270X
		20	318X

Resultados obtenidos de 3 réplicas de ensayos de infección. Los valores de MOI se expresaron como las UFC totales/macrófagos viables en cada tiempo de infección. La cobertura fue expresada como las UFC totales, divididas por la complejidad de la genoteca (~3.700 mutantes).

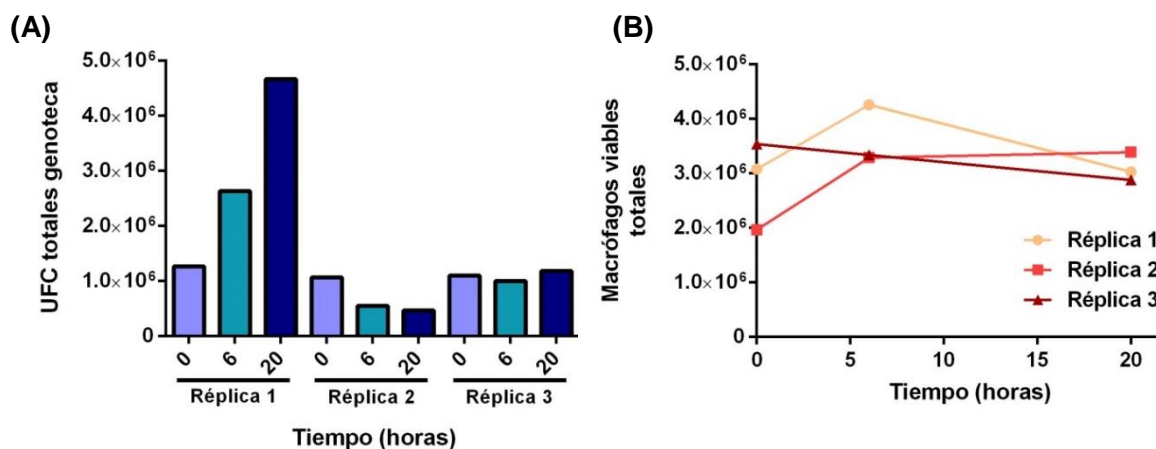


Figura 7. Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos RAW264.7 con la genoteca de mutantes SGD-K de *S. Typhimurium*. Resultados obtenidos de tres réplicas biológicas. (A) Bacterias intracelulares totales obtenidas a las 0, 6 y 20 h post-infección. (B) Macrófagos viables totales obtenidos a las 0, 6 y 20 h post-infección.

6.2.- Construcción de genotecas para secuenciación masiva de DNA genómico mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina*

En nuestro laboratorio se diseñó un protocolo para amplificar la región adyacente al sitio de inserción del *cassette* de Kan^R presente en cada mutante de la genoteca SGD-K. Como se observa en la estructura de las mutantes (Figura 8), las

secuencias P1 y P2 corresponden a regiones comunes que están presentes en todas las mutantes, mientras que las secuencias H1 y H2 corresponden a las regiones variables adyacentes al sitio de la mutación. Estas últimas son únicas y características para cada mutante. Por lo tanto, la identificación de la región variable (tanto por su extremo 5' como por su extremo 3') permite identificar la mutante correspondiente en las diferentes poblaciones.

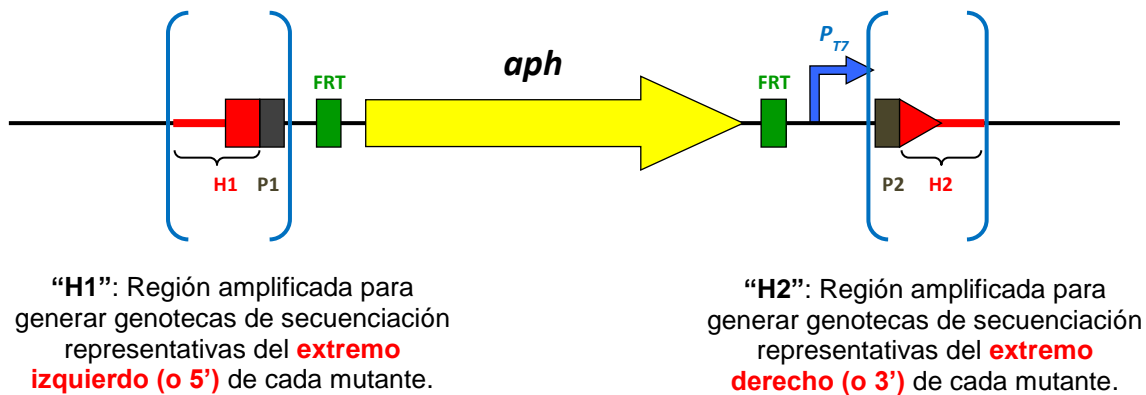


Figura 8. Esquema de la estructura de las mutantes presentes en la genoteca SGD-K y regiones utilizadas para generar una genoteca para secuenciación masiva. FRT: *flipase recombinase target* (secuencias de reconocimiento de la recombinasa FIp). *aph*: aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (gen que confiere resistencia a kanamicina). P_{T7}: promotor reconocido por la RNA polimerasa del fago T7.

El protocolo para generar las genotecas para secuenciación masiva consistió inicialmente en extraer gDNA de cada muestra y evaluar su concentración e integridad. Como se muestra en la **Tabla 5**, la concentración de gDNA fue similar en todas las muestras, lográndose cantidades suficientes para el siguiente paso del protocolo. Respecto a la integridad, en ninguna de las muestra se observó degradación de DNA luego de la extracción. Como referencia, en la **Figura 9A** (primer carril) se puede observar una muestra representativa de gDNA extraído a partir de una de las muestras.

Tabla 5. Pureza y concentración de las muestras de gDNA obtenidas.

Muestras	A_{260}/A_{280}	[gDNA] ng/ μ L
A input	1,564	147
A0	1,827	328
A6	1,848	237,5
A20	1,822	333,5
B input	1,790	217,5
B0	1,825	328,5
B6	1,774	353
B20	1,771	278
C input	1,747	249
C0	1,765	361
C6	1,740	284,5
C20	1,758	312

Tabla resumen que muestra valores de pureza (A_{260}/A_{280}) y concentración de las muestras de gDNA obtenidas a partir de las poblaciones *input* y *output* recuperadas a las 0, 6 y 20 h post-infección desde tres réplicas biológicas del ensayo de protección a gentamicina en macrófagos RAW264.7 con la genoteca de mutantes SGD-K.

El gDNA de cada muestra se digirió con la enzima de restricción *AcI*, obteniéndose una población de tamaños que fluctuaron entre los 50 y 700 pb (**Figura 9A**, carril 3). Posteriormente, se ligaron los oligonucleótidos adaptadores “Adapter CG-end” e “Illumina_index_TGACCT” a ambos extremos de las muestras digeridas usando la enzima T4 DNA ligasa. Estos adaptadores contienen secuencias requeridas para las siguientes etapas de amplificación mediante PCR y secuenciación (P7). Al ligar los adaptadores, el tamaño de los fragmentos de gDNA digeridos aumentó en ~50 pb, lo que resultó en un leve retardo en la movilidad electroforética de éstos (**Figura 9A**, carril 4). Cada una de las muestras ligadas se purificó para eliminar los adaptadores no ligados.

Posteriormente, se amplificaron las muestras ligadas como se describe en la sección 5.8.4 de Materiales y Métodos. Usando el partidor “PCR Primer 2.0” y los partidores de la serie “SGD 5’end code_X”, se amplificaron las secuencias adyacentes al extremo 5’ del *cassette* de Kan^R (regiones H1). Por otra parte, usando el partidor “PCR Primer 2.0” y los partidores de la serie “SGD Index_7nt_X” se

amplificaron las secuencias adyacentes al extremo 3' del *cassette* de Kan^R (regiones H2). En esta primera reacción de PCR se realizaron sólo 10 ciclos de amplificación para no alterar la proporción de moléculas amplificables en cada muestra. En la **Figura 9B** se observa el producto de amplificación de la primera reacción de PCR de una muestra representativa (carril 2), junto a sus respectivos controles (carriles 3 y 4). En el carril 3 se muestra el control negativo sin *taq* DNA polimerasa y en el carril 4 se muestra el control negativo sin DNA. Los productos amplificados se purificaron para eliminar el exceso de partidores remanentes.

En la segunda reacción de PCR, se utilizó el producto de la primera amplificación como templado junto a los partidores “PCR Primer 2.0” e “Illumina_multiplex-forward” que contiene la secuencia P5 necesaria para la secuenciación. En esta segunda reacción de amplificación sólo se realizaron 13 ciclos de amplificación para no alterar la proporción de moléculas amplificables en la muestra. De esta forma, el proceso completo de amplificación contempló un total de 23 ciclos. En la **Figura 9C** se muestra el producto de amplificación de la segunda reacción de PCR de una muestra representativa (carril 2), junto a sus respectivos controles (carriles 3, 4, 5 y 6). En el segundo carril se observa el patrón de amplificación donde aparece una banda inespecífica de menor tamaño (~90 pb) generada por la amplificación entre partidores. Para eliminar esta banda, cada muestra fue purificada desde un gel preparativo al 2% y se analizaron 3 µL de cada muestra purificada en un nuevo gel de agarosa. De manera adicional, como control de especificidad se utilizó gDNA ligado como templado para la segunda reacción de PCR. Como se muestra en el carril 5 de la **Figura 9C**, en presencia de gDNA ligado no hubo amplificación. Esto nos indica que los partidores utilizados en la segunda reacción de PCR son específicos para hibridar con el producto generado en la primera reacción de PCR. Las genotecas para secuenciación generadas se secuenciaron mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina*.

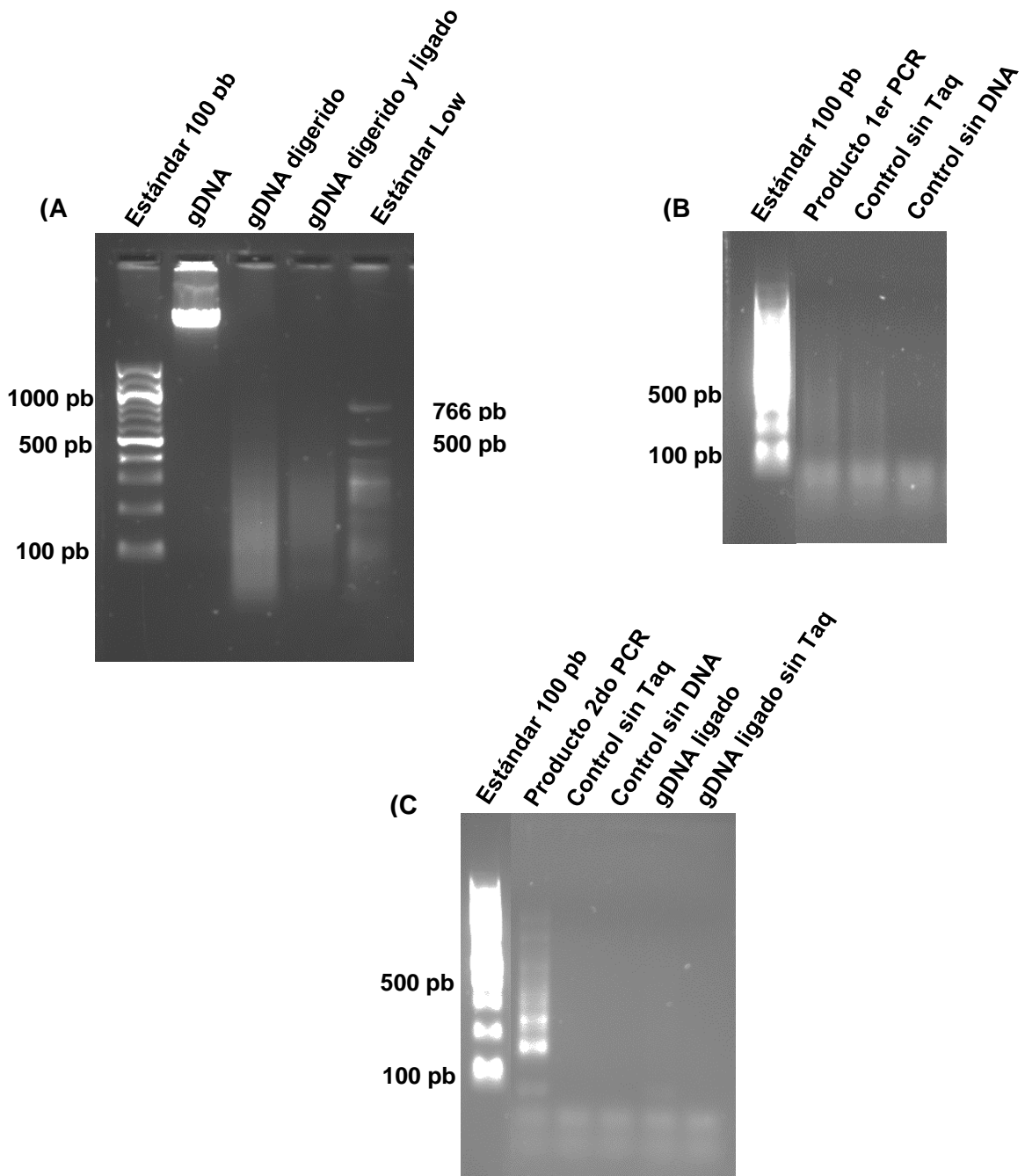


Figura 9.- Geles representativos de las distintas etapas del protocolo de generación de genotecas para secuenciación. Las imágenes corresponden a electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X de productos representativos del tratamiento de muestras de gDNA obtenidas de una condición experimental. En el panel **(A)** se muestra el producto de extracción de gDNA, digestión y la posterior ligación del mismo producto. En el panel **(B)** se muestran los resultados de la primera amplificación por PCR y en el panel **(C)** los de la segunda amplificación por PCR, usando como templado los productos de la primera reacción y gDNA ligado. Los geles fueron teñidos con GelRed y visualizados sobre un transiluminador UV. Estándares de peso molecular utilizados: “1 kb DNA Ladder”, “100 pb DNA Ladder” y “Low Weight DNA Ladder” (New England BioLabs).

6.3.- Secuenciación masiva de las genotecas y análisis de datos generados

Los fragmentos generados en las genotecas para secuenciación contienen secuencias informativas adyacentes al sitio de la mutación (ya sea por el extremo 5' o por el extremo 3' del *cassette* de Kan^R) que permiten la identificación de cada mutante en las distintas muestras. Mediante la secuenciación masiva de estas genotecas se esperaba obtener un conjunto de secuencias que representen regiones discretas del genoma de *S. Typhimurium*. Como resultado de la secuenciación, se obtuvieron 11.483.984 lecturas totales que fueron mapeadas contra el genoma de *S. Typhimurium* 14028s. La estrategia de mapeo consistió en crear una base de datos que contenía las coordenadas de mapeo de las lecturas totales obtenidas y de las secuencias H1 y H2 teóricas de cada mutante en el genoma de *S. Typhimurium* 14028s. Al comparar estas coordenadas, se observó que la mayoría de las lecturas secuenciadas no contenían las secuencias H1 y H2. De éstas, aproximadamente un 2,5% de las lecturas secuenciadas incluían alguna de las secuencias variables H1 o H2. Por lo tanto, más del 95% de todas las lecturas secuenciadas no correspondían a la región adyacente del sitio de inserción del *cassette* de Kan^R.

Este mismo fenómeno se observó con los datos de secuenciación de las muestras obtenidas en ensayos de infección de la ameba *D. discoideum* con la genoteca SGD-K (Tesis de Magíster de Sebastián Riquelme, 2016). Estas genotecas para secuenciación se generaron mediante el mismo protocolo descrito anteriormente. En este caso, sólo el 1.9% de las lecturas secuenciadas totales (10.553.788 lecturas) contenían las secuencias variables H1 y H2. De esta manera, se obtuvieron pocas secuencias informativas que permitieran la comparación entre ambos modelos.

Con el fin de determinar si el problema se generó durante el proceso de construcción de las genotecas para secuenciación, se verificó que las lecturas secuenciadas tuvieran las secuencias de referencia P1 y P2 (regiones constantes que deben estar presentes en todas las mutantes). Se observó que sólo un 2% de las lecturas secuenciadas contenían las regiones P1 y P2, confirmando que un muy bajo porcentaje de las secuencias obtenidas contenían las secuencias requeridas

para identificar las mutantes. Por lo tanto, la obtención de un bajo porcentaje de secuencias informativas indicaría que ocurrieron amplificaciones inespecíficas durante el proceso de generación de las genotecas para secuenciación. Por otra parte, al comparar la abundancia relativa de lecturas que contenía el extremo H1 o 5' en las distintas poblaciones recuperadas desde macrófagos y ameba, se observó que la mayoría de las mutantes presentaron una abundancia relativa similar en ambos modelos, indicando que posiblemente no ocurrió selección de las mutantes durante el proceso infectivo o que el protocolo de amplificación no permitió determinar diferencias en la composición de las poblaciones de mutantes recuperadas a distintos tiempos de infección. Además, al observar las regiones donde mapeaban las lecturas secuenciadas, se descubrió que varias lecturas mapeaban en regiones internas de los genes y no mapeaban en la región adyacente al sitio de inserción.

De esta manera, la base de datos generada mediante la secuenciación masiva de muestras de la genoteca SGD-K no nos permitió obtener información a gran escala sobre los genes de *S. Typhimurium* involucrados en la supervivencia intracelular en macrófagos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*. Dentro de las opciones para solucionar este problema, finalmente se decidió trabajar con una genoteca que contenía ~230.000 mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium* 14028s. Esta genoteca fue utilizada en ensayos de infección simple e infecciones sucesivas en *D. discoideum*, dando como resultado una buena cantidad de datos que permitió identificar un conjunto de genes de *S. Typhimurium* requeridos para sobrevivir dentro de la ameba (Memoria de Título de Bioquímico de Bayron Labra, 2018).

6.4.- Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 usando una genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium*

Se realizaron 6 ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 con la genoteca de mutantes por transposición, siguiendo el protocolo de infección descrito en la sección 5.9 de Materiales y Métodos. De estos ensayos, se

seleccionaron 4 que correspondieron a 3 ensayos simples y un ensayo de infección sucesiva, en el cual se ocupó como muestra *input* la población de bacterias recuperadas a las 20 h post-infección del ensayo C. Estos ensayos se seleccionaron en base a los mismos criterios de infección establecidos anteriormente (sección 6.1). En la **Tabla 6** se muestran los valores de MOI y cobertura de las muestras obtenidas a distintos tiempos de infección. En todas las réplicas se logró obtener coberturas superiores a la mínima requerida para los análisis posteriores (10X), considerando la complejidad de la genoteca (~230.000 mutantes). Esto nos indica que cada mutante de la genoteca estaría representada al menos 10 veces en la población total de mutantes recuperada en cada tiempo de infección.

Tabla 6. Datos de infecciones mediante ensayos de protección a gentamicina en macrófagos murinos RAW264.7 con la genoteca de mutantes de *S. Typhimurium* por transposición.

Réplica	MOI	Tiempo (h)	Cobertura
A	62	0	88X
		6	17X
		20	13X
B	51	0	79X
		6	101X
		20	20X
C	51	0	98X
		6	45X
		20	51X
D	38	0	51X
		6	48X
		20	39X

Resultados obtenidos de 3 réplicas de ensayos de infección simples (réplicas A, B y C) y una réplica de infección sucesiva (réplica D). Los valores de MOI se expresaron como las UFC totales/macrófagos viables en cada tiempo de infección. La cobertura fue expresada como las UFC totales a las 0, 6 y 20 h post-infección, divididas por la complejidad de la genoteca (~230.000 mutantes).

En cada uno de los ensayos se infectaron $\sim 2 \times 10^7$ células con una alícuota de la genoteca. A los distintos tiempos de infección (0, 6 y 20 h) se determinaron las bacterias intracelulares totales (**Figura 10A**) y el recuento de macrófagos viables de cada muestra (**Figura 10B**).

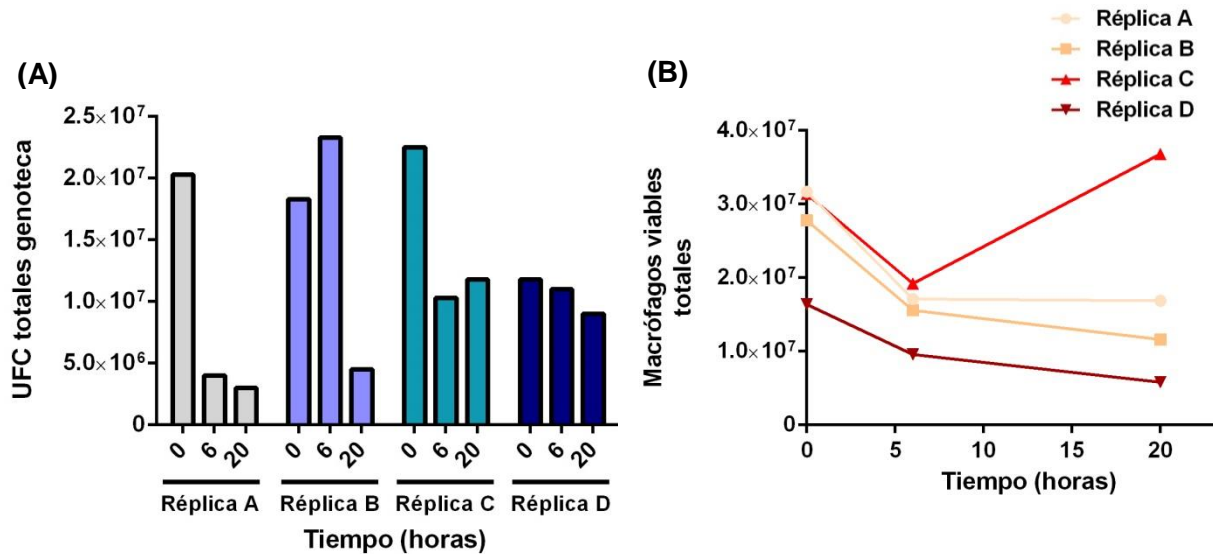


Figura 10. Ensayos de protección a gentamicina en macrófagos RAW264.7 con la genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 en *S. Typhimurium*. Resultados obtenidos de 3 réplicas biológicas de ensayos simples (réplicas A, B y C) y una réplica de un ensayo sucesivo (réplica D). **(A)** Bacterias intracelulares totales recuperadas a las 0, 6 y 20 h post-infección. **(B)** Macrófagos viables totales obtenidos a las 0, 6 y 20 h post-infección.

Como se observa en la **Figura 10A**, en los ensayos simples la población de bacterias disminuyó levemente a tiempos largos de infección (réplicas A, B y C). Sin embargo, en el ensayo de infección sucesiva (réplica D) se puede observar que la población internalizada se mantuvo constante en todos los tiempos estudiados. Adicionalmente, se realizó un segundo ciclo de infección sucesiva a partir de las bacterias intracelulares recuperadas a las 20 h post-infección en la réplica D. Desafortunadamente, fue imposible recolectar bacterias intracelulares a las 6 y 20 h post-infección debido a que la mayoría de los macrófagos se encontraban dañados o muertos, observándose una gran cantidad de bacterias extracelulares en el medio. Por otro lado, en la **Figura 10B** se observa que la población de macrófagos tiende a disminuir a las 6 h post-infección, pero esta población se mantiene constante a tiempos largos de infección.

6.5.- Identificación global de mutantes de *S. Typhimurium* que presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7

Para identificar aquellas mutantes de *S. Typhimurium* que presentaron defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos, se analizaron las poblaciones de mutantes de las muestras *input* y *output* obtenidas a las 0, 6 y 20 h post-infección en las distintas réplicas. Inicialmente, las bacterias intracelulares recuperadas se crecieron en caldo LB a 37°C con agitación durante toda la noche. A partir de estos cultivos se extrajo gDNA y se evaluó su pureza, concentración e integridad de todas las muestras obtenidas (**Tabla 7** y **Figura 11**). Como se observa en la **Tabla 7**, se obtuvieron grados de pureza y concentraciones de gDNA similares en todas las muestras. De igual manera, en la **Figura 11** se observa que no hubo degradación de gDNA durante el proceso de extracción en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 7. Pureza y concentración de las muestras de gDNA obtenidas.

Muestras	A_{260}/A_{280}	[gDNA] ng/mL
A input	1,780	251
A0	1,893	159
A6	1,821	248,5
A20	1,847	265
B input	1,806	261
B0	1,835	183,5
B6	1,701	267
B20	1,785	174
C input	1,805	241
C0	1,817	243,5
C6	1,845	243,5
C20	1,790	239
D input	1,758	269
D0	1,835	238,5
D6	1,810	276
D20	1,793	165

Tabla resumen que muestra valores de la pureza (A_{260}/A_{280}) y concentración de las muestras de gDNA obtenidas a partir de las poblaciones *input* y *output* recuperadas a las 0, 6 y 20 h post-infección. A, réplica 1; B, réplica 2; C, réplica 3; D, ensayo de infecciones sucesivas.

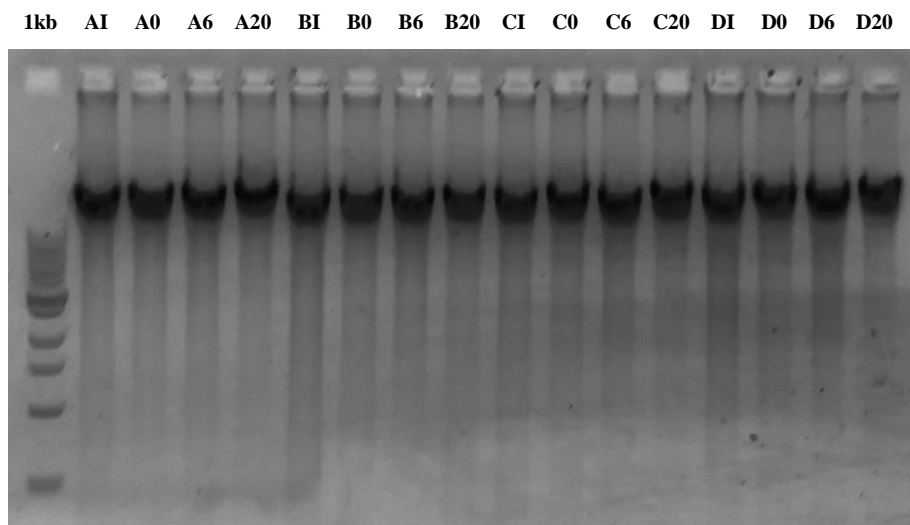


Figura 11. Integridad de las muestras de gDNA obtenidas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X de muestras de gDNA. Se cargaron 3 μ L de cada muestra mezclados con 3 μ L de buffer de carga 2X y se realizó la electroforesis a 100 V durante 25 minutos. El primer carril muestra el estándar de peso molecular de 1 kb y los carriles siguientes corresponden a las muestras de gDNA de todos los ensayos. A, réplica 1; B, réplica 2; C, réplica 3; D, ensayo de infección sucesiva.

Gracias a una colaboración de nuestro grupo con el Dr. Michael McClelland de la Universidad de California en Irvine, CA, USA, las muestras de gDNA fueron amplificadas mediante PCR para generar genotecas para secuenciación, las que se secuenciaron mediante el sistema *HiSeq* de *Illumina*. El proceso de amplificación consistió en enriquecer cada población de fragmentos en secuencias informativas dadas por los códigos de barra o *barcodes* presentes en ambos extremos del transposón. Para amplificar estas regiones, se utilizaron partidores que incorporaron las secuencias necesarias para el proceso de secuenciación. La secuenciación masiva de todas las muestras generadas nos permitió identificar los *barcodes* presentes en cada mutante de cada población. Para poder determinar a qué mutante correspondía cada *barcode*, los fragmentos secuenciados se mapearon contra una base de datos que contenía los *barcodes* asociados al gen mutado de *S. Typhimurium* 14028s y a la posición de la inserción correspondiente.

Las lecturas obtenidas para cada mutante fueron analizadas como se describió en la sección 5.10.1 de Materiales y Métodos. Para identificar las mutantes

de *S. Typhimurium* que presentaron defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos luego de 6 h de infección, se calculó el $\text{Log}_2(T_6/T_0)$ de las lecturas correspondientes a las poblaciones recuperadas a las 0 y 6 h post-infección, normalizados por el total de lecturas obtenidas en cada tiempo (abundancia relativa). Adicionalmente, se compararon las diferencias entre las 3 réplicas a T_0 y T_6 mediante la prueba estadística *t* de Student. A partir de estos dos criterios, se consideró bajo selección negativa a aquellas mutantes que presentaron un valor de $\text{Log}_2(T_6/T_0) \leq -1$ (es decir, que la abundancia relativa de una mutante a las 6 h disminuyera a la mitad respecto a la abundancia relativa a las 0 h) y que este valor tuviera significancia estadística ($P \leq 0,05$). Con el fin de aumentar la estrictez del análisis, se consideró como tercer criterio que los genes identificados mediante el análisis de los datos presentaran al menos 3 mutantes (inserciones) independientes que cumplieran los criterios anteriores.

De acuerdo a este análisis se determinó que mutantes en 719 genes de *S. Typhimurium* estarían bajo selección negativa, lo que sugiere que estos genes son necesarios para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos. El listado completo de los genes de *S. Typhimurium* cuyas mutantes se encuentran bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 se muestra en la **Tabla A** de la sección Anexos.

Los genes correspondientes a las mutantes identificadas fueron clasificados según las categorías funcionales asociadas a las proteínas que codifican, mediante un análisis de *Clusters of Orthologous Groups* (COGs) (**Tatusov et al., 2000**). En la **Figura 12** se puede observar que dentro de las categorías con mayor abundancia se encuentran genes que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida (315 genes), genes de metabolismo y transporte de aminoácidos (63 genes), genes de metabolismo y transporte de carbohidratos (53 genes) y genes asociados a la biogénesis de la envoltura, membrana y pared celular (38 genes). El análisis de estos datos mostró la pérdida de mutantes de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de compuestos aromáticos (*aroA* y *aroE*), la biosíntesis y transporte de aminoácidos (*gltB*, *gltD*, *gltK*, *ilvB*, *ilvG*, *ilvD*, *leuC*, *thrB*, *thrC*, *proP*,

proV, *aspA*, *avtA* y *yfbQ*), el metabolismo de purinas (*purC*, *purD*, *purK*, *purM* y *purN*) y el metabolismo de carbohidratos (*pfkA*, *glpK*, *glpF*, *glpQ*, *glpB*, *manC*), genes que codifican reguladores globales que participan en la respuesta a estímulos externos (*barA*, *arcA* y *rscC*) y genes que codifican proteínas relacionadas con la biosíntesis del LPS (*waaL*, *waaZ*, *waaY*, *waaJ*, *waal*, *waaB*, *wbaP*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaN*, *wbaC*, *wbaD* y *wbaB*).

También se identificó un grupo de genes codificados en islas de patogenicidad conservadas en *Salmonella*, como SPI-1 (*sprB*, *orgA*, *prgK*, *prgJ*, *prgH*, *hilD*, *hilA*, *iagB*, *sptpB*, *sipA*, *sipC*, *sipB*, *sicA*, *spaR*, *spaP*, *spaO*, *invI*, *invF*, *invG*, *invE*, *invA*, *invB* e *invH*), SPI-2 (*sseF*), SPI-3 (*sugR*, *misL*, *marT*, *cigR* y *mgtB*) y SPI-5 (*pipA* y *pipD*). Por otra parte, se identificaron genes asociados a estrés oxidativo (*msrA*) y estrés nutricional (*spoT* y *relA*), genes asociados a reparación del DNA (*uvrD* y *mutL*) y genes relacionados con resistencia a péptidos antimicrobianos (*pgtE*). Adicionalmente, se identificaron genes que codifican el sistema de secreción de proteínas Tat (*tatB* y *tatC*) y proteínas secretadas por este sistema (*amiC* y *amiB*). Algunos de estos genes han sido reportados en la literatura como necesarios para la supervivencia de *Salmonella* en macrófagos murinos y en modelos animales (**Chan et al., 2005; Silva-Valenzuela et al., 2015**).

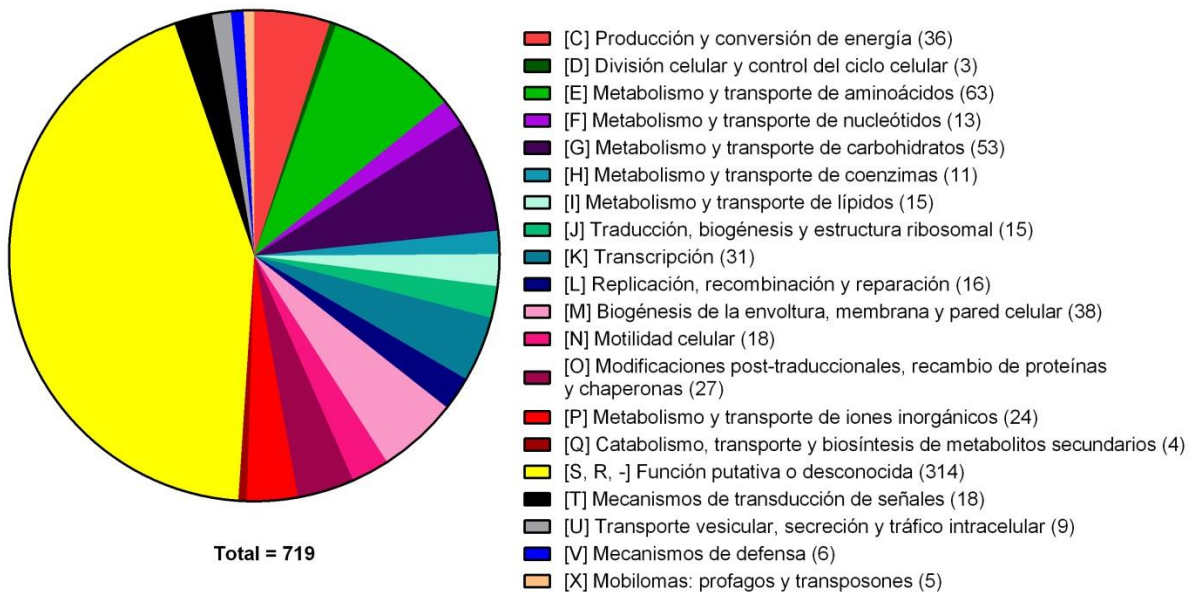


Figura 12. Categorías funcionales de las proteínas codificadas por genes de *S. Typhimurium* cuyas mutantes presentan selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 luego de 6 h post-infección.

De igual manera, se analizaron los datos de secuenciación correspondientes al tiempo 20 h considerando los mismos criterios de selección: $\text{Log}_2(T_{20}/T_0) \leq -1$; $P \leq 0,05$ y que los genes identificados mediante el análisis de los datos presentaran al menos 3 mutantes independientes que cumplieran estos criterios. De acuerdo a este análisis, se determinó que mutantes en 2.557 genes de *S. Typhimurium* estarían bajo selección negativa siendo necesarios para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos luego de 20 h de infección. La gran cantidad de genes bajo selección negativa (que en su totalidad representan más del 50% de los genes de *S. Typhimurium*) podría deberse a la formación de un cuello de botella (“*bottleneck*”) severo, donde la pérdida de mutantes en la población se esté produciendo por eventos estocásticos y no por una deficiencia en el *fitness* de las mutantes que le impidan sobrevivir dentro de macrófagos (Santiviago *et al.*, 2009). Por lo tanto, los criterios de selección adoptados no serían lo suficientemente estrictos como para diferenciar entre mutantes que se pierden al azar y mutantes que presentan un defecto en su supervivencia producto de la ausencia del gen mutado a tiempos

tardíos de infección (20 h). Por otra parte, los resultados de la secuenciación del ensayo sucesivo (réplica D) presentaron el mismo problema, en donde muchas mutantes se perdieron de la población inicial producto de un posible cuello de botella severo en todos los tiempos estudiados (0, 6 y 20 h). Por este motivo, sólo se utilizaron los datos obtenidos a las 6 h post-infección de los ensayos A, B y C para los análisis posteriores.

6.6.- Análisis comparativo de mutantes de *S. Typhimurium* bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*

Una vez obtenida la base de datos con las mutantes de *S. Typhimurium* bajo selección negativa en macrófagos murinos, se realizó un análisis comparativo con una base de datos con las mutantes bajo selección negativa en *D. discoideum* (Memoria de Título de Bioquímico de Bayron Labra, 2018) para identificar un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en ambas células fagocíticas. Para obtener los datos de mutantes bajo selección negativa en *D. discoideum*, se infectó la ameba con la misma genoteca de mutantes de *S. Typhimurium* por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 utilizada en esta tesis. A partir de las muestras *input* (0 h) y *output* (6 h) se extrajo gDNA para generar genotecas para secuenciación que fueron secuenciadas mediante el sistema *HiSeq* de *Illumina*. Los datos de la secuenciación reportados en la Memoria de Título de Bioquímico de Bayron Labra (2018) se analizaron de la misma manera en la que se analizaron los datos obtenidos en macrófagos descrito en la sección 5.10.1 de Materiales y Métodos. Considerando los 3 criterios de selección antes mencionados, se determinó que mutantes en 348 genes de *S. Typhimurium* estarían bajo selección negativa en *D. discoideum*. Entre ellos, se encontraron genes relacionado con el metabolismo y transporte de aminoácidos (*thrA*, *trpB*, *ilvED*, *ilvC*, *lysP*, *metB*, *ssrT*, *proV*, *tdcB* y *tdcC*), genes involucrados el metabolismo de carbohidratos (*manM*, *gnd*, *mgIA*, *araE*, *tktA*, *malP*, *lsrD*, *lsrB* y *lsrF*), genes codificados en islas de patogenicidad como SPI-1 (*hilA*, *sptP*, *sipA*, *sipD*, *sipC*, *spaR*, *invA*, *invG* y *invF*), SPI-2 (*ssrA*) y SPI-3 (*sugR*, *rhuM*, *misL*, *fidL*, *marT*, *cigR*, *mgtB* y *yicL*), genes que codifican bombas de expulsión (*acrAB*, *acrD* y *acrEF*),

genes relacionados con la biosíntesis y modificaciones del LPS (*pmrA*, *waaL*, *waaK*, *waaJ*, *waaZ*, *waal*, *waaB*, *wbaP*, *wbaN*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaD*, *wbaC*, *oafA*, *eptA*, *wzz_{tepE}* y *arnT*) y genes codificados en el plasmidio de virulencia de *Salmonella* (operón *spv*), entre otros.

Finalmente, al hacer el análisis comparativo entre estos datos y la base de datos generada en esta tesis se identificaron mutantes en 213 genes de *S. Typhimurium* que presentaron selección negativa tanto en macrófago murinos como en *D. discoideum* (**Figura 13**). Por lo tanto, estos genes serían necesarios para la supervivencia intracelular en ambas células fagocíticas. El listado total de mutantes bajo selección negativa en ambos modelos se muestra en la **Tabla B** de la sección Anexos.

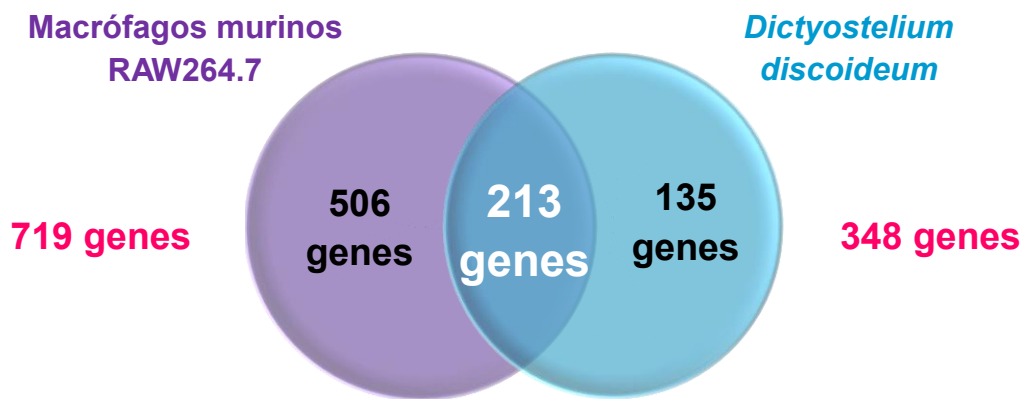


Figura 13. Genes de *S. Typhimurium* 14028s bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*. El diagrama de Venn muestra el número total de genes, cuyas mutantes se seleccionaron negativamente en cada modelo estudiado por separado (negro) junto al número total de genes requeridos para la supervivencia tanto en macrófagos murinos como en la ameba *D. discoideum* (blanco). El número de genes se obtuvo según los criterios establecidos en Materiales y Métodos, sección 5.10.1.

En la **Figura 14** se muestran las categorías funcionales (COGs) de las proteínas codificadas en los 213 genes comunes requeridos para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos y en *D. discoideum*. De manera similar a lo observado en el análisis de mutantes bajo selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7, las categorías funcionales predominantes

corresponden a genes que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida (100 genes), genes que codifican proteínas involucrados en la biogénesis de la envoltura (17 genes), metabolismo y transporte de carbohidratos (16 genes) y metabolismo y transporte de aminoácidos (16 genes).

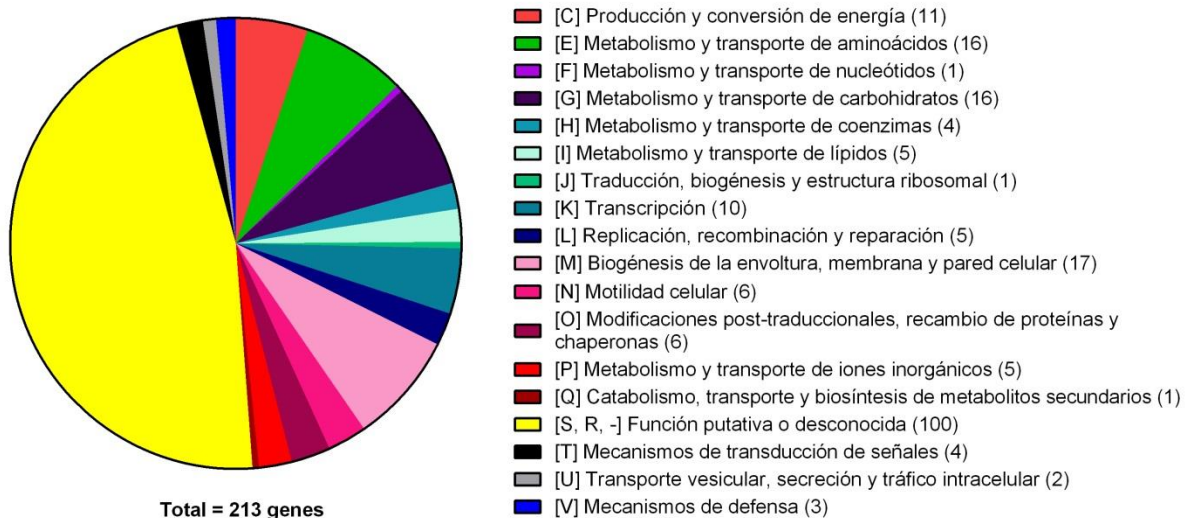


Figura 14. Categorías funcionales de las proteínas codificadas por genes de *S. Typhimurium* cuyas mutantes presentan selección negativa en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*.

De esta manera, se observó la pérdida de mutantes en genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (*gnd*, *malP*, *fum-1*, *bcsC* y *dcuB*), genes asociados a la utilización de citrato como fuente de carbono en condiciones anaeróbicas (*citA* y *citC*), genes involucrados en la captación de hierro (*iroC*, *iroN* y *feoB*) y genes que codifican transportadores de metales (*zntA* y *trkD*). También se identificaron genes codificados en islas de patogenicidad de *Salmonella* como SPI-1 (*hilD*, *hilA*, *sptP*, *sipA*, *sipC*, *spaR*, *invA*, *invG* e *invF*) y SPI-3 (*rhuM*, *misL*, *marT* y *mgtB*), junto a genes que codifican efectores del T3SS_{SPI-1} (*slrP*). Además, se identificaron genes relacionados con la respuesta a estrés por hambruna (*spoT*) y por pH ácido (*adiY*).

Por otra parte, también se identificaron genes implicados en la síntesis del LPS como por ejemplo, genes asociados a la síntesis del *core* externo (*waaB*, *waal*, *waaJ*, *waaL* y *waaZ*), genes asociados a la síntesis del antígeno O (AgO) (*wbaC*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaN*, *wbaD* y *oafA*) y genes asociados a la regulación del grado de polimerización del antígeno-O (*WZZ_{tepE}*).

Debido a que varias mutantes de *S. Typhimurium* en genes asociados a la síntesis y modificación del LPS se encontraron bajo selección negativa en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*, sumado a que existe poca información sobre el rol de LPS en la supervivencia de *Salmonella* en amebas, se escogieron mutantes de esta categoría para confirmar la información obtenida a partir de nuestro análisis comparativo. Dentro de los genes con mayor número de mutantes independientes que presentaron selección negativa en nuestro análisis destaca el gen *waaL* (26 mutantes independientes bajo selección en macrófagos murinos y 85 mutantes independientes bajo selección en *D. discoideum*). Las mutantes nulas del gen *waaL* carecen de la ligasa del AgO, por lo que son incapaces de unir el AgO al *core* externo del lípido A en la estructura del LPS, adquiriendo un fenotipo “rugoso”.

Además, se seleccionó el operón *arnBCADTEF* (también llamado *pmrHFIJKLM*), ya que mutantes en el gen *arnT* se encontraron bajo selección negativa en macrófagos murinos (6 mutantes independientes) y mutantes en los genes *arnA* (4 mutantes independientes), *arnE* (*pmrL*, 8 mutantes independientes) y *arnF* (*pmrM*, 11 mutantes independientes) se encontraron bajo selección negativa en *D. discoideum*. Este operón codifica las enzimas ArnB, ArnC, ArnA, ArnD, ArnT, ArnE y ArnF, encargadas de la síntesis e incorporación de una molécula de 4-amino-4-desoxi- α -L-arabinosa (α -L-Ara4N) al lípido A.

Finalmente, se seleccionó el gen *wzz_{tepE}*, ya que mutantes en el gen *wzz_{tepE}* presentaron selección negativa en ambos modelos (4 mutantes independientes en macrófagos RAW264.7 y 12 mutantes independientes en *D. discoideum*). Este gen codifica uno de los reguladores del largo de cadena del AgO, siendo responsable de la distribución modal VL-AgO (“*very long O antigen*”) que presenta 100 unidades

repetidas de AgO. Para tener una visión global de la importancia del tamaño del AgO de *S. Typhimurium* en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos y en *D. discoideum*, adicionalmente se evaluó el gen *wzz_{ST}* que codifica un segundo regulador del largo de cadena del AgO, responsable de la distribución modal L-AgO (“*long O antigen*”) que presenta 16 a 35 unidades repetidas de AgO.

6.7.- Mutantes de genes de *S. Typhimurium* relacionados con la biosíntesis y modificaciones del LPS son atenuados en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*

Con el objetivo de confirmar las predicciones obtenidas en el análisis comparativo, se generaron mutantes por delección de los genes mencionados. Estas mutantes se construyeron mediante el método de reemplazo alélico por recombinación de productos de PCR (**Datsenko and Wanner, 2000**) y fueron analizadas mediante ensayos de competencia *in vitro* en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*, como se describe en la sección 5.13 de Materiales y Métodos. En estos ensayos, se utilizó una MOI de 50 bacterias/macrófago o 100 bacterias/ameba y la infección se realizó con una mezcla en partes iguales de cultivos independientes de la cepa silvestre y la cepa mutante a analizar. Finalmente, se obtuvo el recuento de bacterias intracelulares y recuento de células viables a las 0, 6 y 20 h post-infección en macrófagos murinos y a las 0, 3 y 6 h post-infección en *D. discoideum*. El recuento de bacterias intracelulares se obtuvo mediante dilución seriada y siembra en placas de agar LB y LB suplementado con Kan para obtener las UFC totales y las UFC correspondiente a la cepa mutante, respectivamente. Con estos valores se calculó el Índice de Competencia (IC) mediante la fórmula descrita en la sección 5.11.4 de Materiales y Métodos y los datos se expresaron como $\text{Log}_{10}(\text{IC})$. De esta manera, si el valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es > 0 indica que la cepa mutante sobrevive/invade más que la cepa silvestre dentro de las células. Por el contrario, si el valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es < 0 indica que la cepa mutante sobrevive/invade menos que la cepa silvestre. Por último, si el valor de $\text{Log}_{10}(\text{IC})$ es igual a 0 indica que la cepa mutante sobrevive/invade de igual manera que la cepa silvestre. Se utilizó como control la cepa mutante ΔaroA , que presenta defectos en la

biosíntesis de compuestos aromáticos y se caracteriza por ser una cepa avirulenta incapaz de sobrevivir intracelularmente en macrófagos murinos (**Fields et al., 1986**) y en *D. discoideum* (**Riquelme et al., 2016**). Los resultados de los ensayos de competencia en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum* se muestran en la **Figura 15** y **Figura 16**, respectivamente.

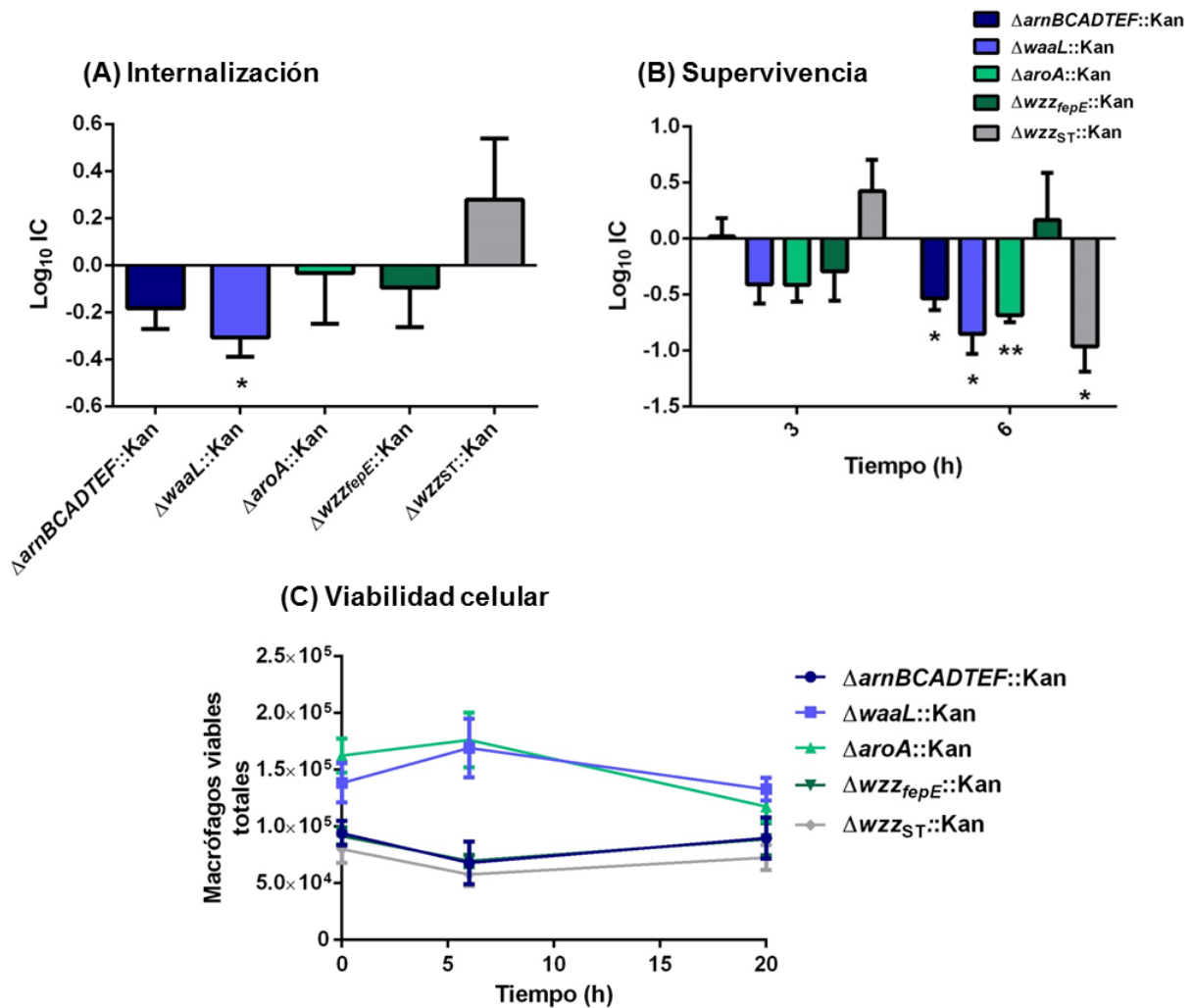


Figura 15. Ensayos de competencia *in vitro* entre la cepa silvestre y las cepas mutantes Δ arnBCADTEF, Δ waaL, Δ aroA, Δ wzz_{lepE} y Δ wzz_{ST} de *S. Typhimurium* 14028s en macrófagos murinos RAW264.7. (A) Internalización relativa a la cepa silvestre calculada como: (CFU cepa mutante / CFU cepa silvestre)_{T0} / (CFU cepa mutante / CFU cepa silvestre)_{inóculo} y expresada como Log₁₀. (B) Supervivencia relativa a la cepa silvestre calculada como: (CFU cepa mutante / CFU cepa silvestre)_{Tx} / (CFU cepa mutante / CFU cepa silvestre)_{T0} y expresada como Log₁₀, donde Tx corresponde a 6 o 20 h post-infección. (C) Macrófagos viables totales obtenidos a las 0, 6 y 20 h post-infección. Los gráficos muestran valores promedio de 3 o más réplicas biológicas ± SEM. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba *t* de Student de dos colas (* P < 0,05; ** P < 0,01; * P < 0,005).**

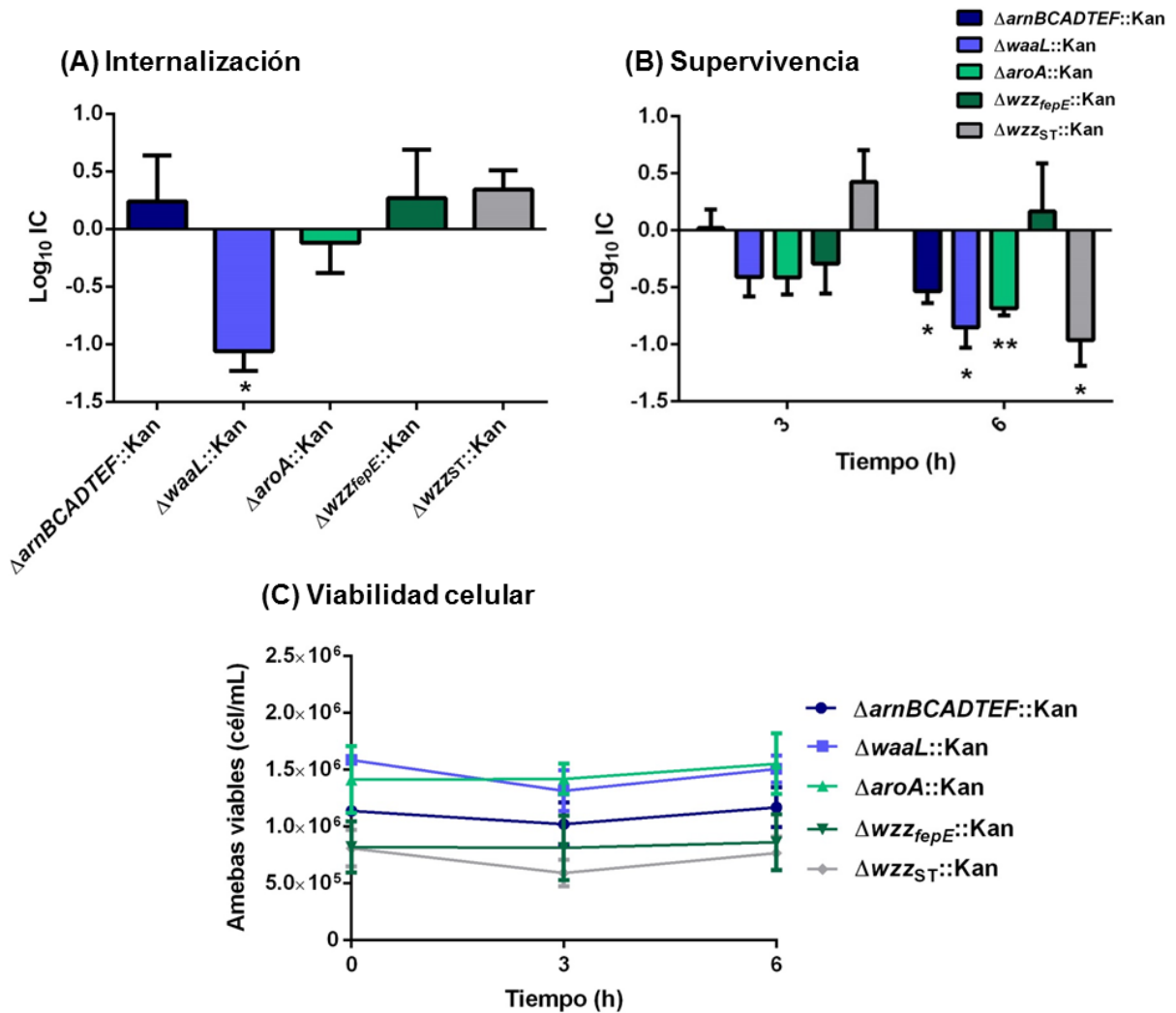


Figura 16. Ensayos de competencia *in vitro* entre la cepa silvestre y las cepas mutantes $\Delta arnBCADTEF$, $\Delta waaL$, $\Delta aroA$, Δwzz_{fepE} y Δwzz_{ST} de *S. Typhimurium* 14028s en *D. discoideum*. (A) Internalización relativa a la cepa silvestre calculada como: $(CFU \text{ cepa mutante} / CFU \text{ cepa silvestre})_{T_0} / (CFU \text{ cepa mutante} / CFU \text{ cepa silvestre})_{in\acute{o}culo}$ y expresada como Log_{10} . (B) Supervivencia relativa a la cepa silvestre calculada como: $(CFU \text{ cepa mutante} / CFU \text{ cepa silvestre})_{T_x} / (CFU \text{ cepa mutante} / CFU \text{ cepa silvestre})_{T_0}$ y expresada como Log_{10} , donde Tx corresponde a 3 o 6 h post-infección. (C) Amebas viables totales obtenidos a las 0, 3 y 6 h post-infección. Los gráficos muestran valores promedio de 3 o más réplicas biológicas \pm SEM. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante la prueba *t* de Student de dos colas (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Los resultados de los ensayos de competencia en macrófagos RAW264.7 muestran que la mutante $\Delta waaL$, carente de AgO, invade menos que la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, indicando que la presencia de AgO completo sería

necesaria para que *Salmonella* sea fagocitada por macrófagos. Por el contrario, las mutantes $\Delta arnBCADTEF$, $\Delta aroA$, Δwzz_{lepE} y Δwzz_{ST} invaden de igual manera que la cepa silvestre (**Figura 15A**). Respecto a la supervivencia intracelular en macrófagos RAW264.7, la mutante $\Delta waaL$ sobrevive menos que la cepa silvestre tanto a las 6 h como a las 20 h de infección, observándose un fenotipo atenuado más pronunciado a tiempos más tardíos (**Figura 15B**). Es probable que la carencia de AgO favorezca la degradación bacteriana al dejar más expuesta la membrana externa de la bacteria a agentes antimicrobianos. Adicionalmente, esta mutante mostró un grado de atenuación bastante similar al presentado por la mutante $\Delta aroA$, donde ambas mutantes sobreviven ~7 veces menos que la cepa silvestre a tiempos tardíos de infección. La mutante $\Delta aroA$ se ha utilizado ampliamente como control en diferentes modelos de infección ya que presenta defectos pleiotrópicos por su incapacidad de sintetizar compuestos aromáticos. Por otra parte, de las dos mutantes en genes que codifican reguladores del largo de cadena del AgO, sólo la mutante Δwzz_{ST} presentó defectos en supervivencia. Esto sugiere que el largo de cadena L-AgO (que corresponde a una distribución modal de 16 a 35 unidades repetidas de AgO) es necesario para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos. De este modo, el largo de cadena VL-AgO (dependiente del regulador codificado por el gen wzz_{lepE}) no contribuiría a la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos murinos. Por último, la mutante $\Delta arnBCADTEF$ sólo presentó defectos en la supervivencia intracelular a las 20 h post-infección, sugiriendo que la adición de 4-aminoarabinosa al lípido A contribuye en la supervivencia de *Salmonella* en macrófagos murinos a tiempos tardíos de infección (**Figura 15**).

Por otra parte, en los ensayos de competencia en la ameba *D. discoideum* se observó que la única mutante con defectos en la invasión fue $\Delta waaL$, al igual que en macrófagos murinos (**Figura 16A**). De hecho, esta mutante es fagocitada ~10 veces menos que la cepa silvestre. Es posible que la presencia de un AgO completo sea necesaria para que *Salmonella* sea reconocida y fagocitada por la ameba. Por otra parte, las mutantes $\Delta waaL$, $\Delta arnBCADTEF$, Δwzz_{ST} y $\Delta aroA$ presentaron defectos en la supervivencia intracelular luego de 6 h de infección (**Figura 16B**). La mutante $\Delta waaL$ sobrevivió ~8 veces menos que la cepa silvestre y la cepa $\Delta aroA$ sobrevivió

~6 veces menos que la cepa silvestre. Estos grados de atenuación son bastante similares a los obtenidos en macrófagos murinos a las 20 h post-infección. Por el contrario, la mutante $\Delta arnBCADTEF$ alcanzó una atenuación más pronunciada en la ameba, sobreviviendo ~5 veces menos que la cepa silvestre. Es probable que la modificación del lípido A con 4-aminoarabinosa le otorgue protección a *Salmonella* frente al ataque de agentes antimicrobianos dentro de la ameba. Finalmente, la mutante Δwzz_{ST} sobrevivió ~9 veces menos que la cepa silvestre en *D. discoideum*. Se puede observar que esta mutante presenta un defecto mayor en la supervivencia intracelular en la ameba que en macrófagos murinos. Diferente es el caso de la mutante Δwzz_{lepE} , que mostró una supervivencia intracelular similar a la cepa silvestre, indicando que el regulador del largo de cadena VL-AgO no sería relevante para la supervivencia de *Salmonella* en ambas células fagocíticas.

Por último, en las **Figuras 15C** y **16C** se puede observar que las poblaciones de macrófagos y de amebas viables no variaron a lo largo de los ensayos, indicando que las cepas utilizadas no generan daño celular en los distintos tiempos de infección. Esto indica que el efecto atenuado de las mutantes no está asociado a una menor recuperación de bacterias intracelulares producto de un menor número de células viables.

En conjunto, estos resultados demuestran la importancia del LPS de *S. Typhimurium* en la invasión y supervivencia intracelular del patógeno en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*.

7.- DISCUSIÓN

Salmonella Typhimurium es uno de los principales agentes causantes de enteritis a nivel mundial. Su propagación se produce por vía fecal-oral a través del consumo de alimentos y agua contaminada. Una vez dentro del hospedero, *S. Typhimurium* puede cruzar la barrera epitelial intestinal e interactuar con células fagocíticas profesionales del sistema inmune innato, causando una respuesta inflamatoria local que promueve la excreción de *Salmonella* al medio ambiente. La patogenicidad de *Salmonella* se debe principalmente a su capacidad de sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, las cuales participarían como vectores de diseminación dentro de un hospedero infectado. En la literatura se han descrito en detalle los mecanismos utilizados por *Salmonella* para adaptarse a las condiciones adversas dentro de los macrófagos, donde destacan diversos factores de virulencia como T3SS_{SPI-1}, T3SS_{SPI-2}, el LPS y distintos sistemas de dos componentes que modulan la expresión de genes necesarios para contrarrestar la acción del estrés oxidativo y nitrosativo y de péptidos antimicrobianos (**Cirillo et al., 1998; Hensel et al., 1998; Chan et al., 2005**). Sin embargo, el rol de estos factores en otros estadios del ciclo infectivo de *Salmonella* ha sido menos caracterizado.

En el ambiente, *Salmonella* interacciona con una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, plantas, hongos y protozoos. Dentro de los protozoos encontramos a las amebas, que son células eucariontes unicelulares que viven en suelos de bosques y cursos de agua y se alimentan de bacterias y hongos mediante mecanismos de fagocitosis similares a las células fagocíticas profesionales de mamíferos. En la literatura se ha demostrado que diferentes bacterias (*L. pneumophila* y especies de *Mycobacterium*) utilizan mecanismos moleculares similares para sobrevivir dentro de macrófagos murinos y amebas (**Salah et al., 2009; Escoll et al., 2013**).

El desarrollo de nuevas técnicas genómicas ha permitido realizar estudios a gran escala para evaluar genes requeridos para la supervivencia intracelular bacteriana en diferentes células hospederas. La estrategia más utilizada consiste en

analizar genotecas de mutantes por inserción al azar de un transposón en un ambiente selectivo. La pérdida de una mutante de la población inicial indica que el transposón interrumpió un gen esencial para la supervivencia intracelular del patógeno en ese ambiente selectivo. La posición del transposón puede ser detectada por amplificación del gDNA adyacente al sitio de inserción y posterior hibridación competitiva utilizando microarreglos genómicos. En *Salmonella*, esta estrategia ha sido utilizada ampliamente, reportándose estudios en macrófagos murinos RAW264.7, macrófagos humanos THP-1 y ratones BALB/c y 129X1/SvJ (**Chan et al., 2005; Lawley et al., 2006; Sabbagh et al., 2012**).

Con el propósito de conocer si *Salmonella* utiliza los mismos mecanismos para sobrevivir dentro de distintas células fagocíticas, en esta tesis se propuso identificar de manera global un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* que le permitan sobrevivir intracelularmente en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum* AX4. En primer lugar, se utilizó una genoteca de mutantes por reemplazo alélico de *S. Typhimurium* 14028s (SGD-K) para infectar macrófagos murinos mediante ensayos clásicos de protección a gentamicina. Luego, diseñamos un protocolo para generar genotecas para secuenciación mediante PCR, utilizando partidores con secuencias específicas (*barcodes*) para diferenciar las muestras de los diferentes tiempos de infección. De esta manera, el producto final de las genotecas generadas quedó compuesto por una región central que contiene una secuencia específica (*barcode*) y un segmento del *cassette* de Kan^R flanqueado por una región constante P1 (5') o P2 (3') seguida de una región variable H1 (5') o H2 (3') característica de cada mutante más algunas secuencias particulares requeridas para la secuenciación (**Figura 5 y 8**). El producto final fue secuenciado mediante el sistema *MiSeq* de *Illumina* y mapeado contra el genoma de *S. Typhimurium* 14028s para identificar las mutantes presentes en las poblaciones *input* y *outputs* (0, 6 y 20 h). El mapeo de estas secuencias se realizó mediante la creación de coordenadas de mapeo de las lecturas secuenciadas totales y las secuencias H1 y H2 de cada mutante contra el genoma de *S. Typhimurium* 14028s. Es importante mencionar que las secuencias H1 y H2 contienen 40 nucleótidos idénticos a la región que flanquea al *cassette* de Kan^R presente en cada gen mutado. De esta forma, todas las

mutantes de la genoteca SGD-K contienen su propia secuencia H1 y H2. Al comparar las coordenadas observamos que la mayoría de las lecturas secuenciadas mapeadas contra el genoma y las secuencias H1 y H2 mapeadas contra la misma base de datos no coincidían entre sí. Este problema se produjo porque la mayoría de las lecturas secuenciadas no contenía las regiones variables H1 y H2 ni las regiones constantes P1 y P2 presente en todas las mutantes. Por lo tanto, las lecturas secuenciadas mapeaban en regiones del genoma que no correspondían a la región informativa de cada mutante, que es la región adyacente al sitio de inserción del *cassette* de Kan^R. Una explicación al bajo rendimiento de lecturas correctamente mapeadas sería que durante el proceso de generación de las genotecas de secuenciación ocurrieron amplificaciones inespecíficas en regiones del genoma que no correspondían a la región adyacente al sitio de mutación.

Por otra parte, observamos que la abundancia relativa de las pocas lecturas mapeadas correctamente no varió entre los diferentes tiempos de infección, tanto en macrófagos murinos (resultados de esta tesis) como en *D. discoideum* (resultados de la Tesis de Magíster de Sebastián Riquelme, 2016). Este problema se pudo generar debido al uso de una enzima de restricción como método de fragmentación del DNA, donde el corte está definido por una secuencia cuyo patrón de corte se repite en todas las poblaciones. Por ejemplo, si el sitio de corte de la enzima de restricción queda muy cerca al sitio de mutación, jamás se logrará pesquisar la mutante en ninguna de las poblaciones analizadas. Una solución alternativa para evitar este sesgo sería reemplazar el uso de una endonucleasa por un método de fragmentación mecánica. La fragmentación por sonicación permite obtener cortes aleatorios en el DNA, generando diferentes tamaños de fragmentos para una misma mutante y aumentando la probabilidad de obtener algún fragmento amplificable y detectable.

Ante estos inconvenientes, el protocolo de amplificación diseñado para enriquecer las muestras en fragmentos de interés no nos permitió identificar un número apropiado de mutantes de *S. Typhimurium* en ninguno de los modelos estudiados. Como alternativa, se utilizó otra genoteca de mutantes de *S. Typhimurium* construida por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5.

La ventaja de esta genoteca es que las mutantes generadas presentan un transposón que posee secuencias específicas localizadas en ambos extremos del transposón. La detección de estas secuencias específicas ("barcodes") nos permitió identificar las mutantes presentes en las distintas poblaciones estudiadas. A partir de la base de datos generada, logramos identificar 719 genes de *S. Typhimurium* cuyas mutantes presentaron selección negativa en macrófagos murinos, indicando que estos genes serían relevantes para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en este modelo. Entre las mutantes seleccionadas encontramos genes localizados en islas de patogenicidad como SPI-1, SPI-2, SPI-3 y SPI-5. A pesar que la isla SPI-1 es conocida mayormente por su rol en la invasión de células no fagocíticas, otro análisis a escala genómica de mutantes por transposición de *S. Typhimurium* también mostró un gran número de mutantes de la isla SPI-1 bajo selección negativa *in vitro* en macrófagos murinos RAW264.7 luego de tres rondas de infección (**Chan et al., 2005**). Sin embargo, al analizar cada mutante de manera individual, los autores observaron que la mayoría de las mutantes de la isla SPI-1 no contribuían a la supervivencia intracelular en macrófagos murinos. A pesar de esto, se ha reportado que algunos efectores del T3SS_{SPI-1}, como SipA, permanecen dentro de células epiteliales y macrófagos por horas, contribuyendo en etapas posteriores a la invasión, como en el posicionamiento perinuclear e integridad de la SCV dentro de la célula (**Brawn et al., 2007**). Además, se observó que la mutante $\Delta sipA$ presenta defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos, mientras que la cepa complementada en *trans* restauró su fenotipo mejorando su capacidad de supervivencia intracelular (**Brawn et al., 2007**). De esta manera, ciertos efectores de la isla SPI-1 podrían contribuir en la formación de un nicho replicativo adecuado dentro de células no fagocíticas y fagocíticas.

Particularmente, nos llamó la atención la poca cantidad de mutantes en genes de la isla SPI-2 bajo selección negativa en nuestro análisis masivo (*sseF*). En la literatura se ha reportado ampliamente el rol que tiene el sistema T3SS_{SPI-2} en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos (**Cirillo et al., 1998; Hensel et al., 1998; Chan et al., 2005; Srikumar et al., 2015**). Sin embargo, al analizar nuestros datos pudimos observar que las mutantes de los genes *sseG*, *sseI*, *sseA*,

sscB también presentan valores de $\text{Log}_2(T_6/T_0) \leq -1$ asociados a valores de $P \leq 0,05$ pero quedaron excluidos de nuestro análisis final al presentar sólo 1 o 2 inserciones independientes dentro del gen correspondiente que cumplieran estos criterios. De esta manera, el último criterio mencionado aumentó la estrictez de nuestro análisis, dejando fuera a mutantes de genes que presentarían fenotipos atenuados en este modelo.

Otras mutantes que se encontraron bajo selección negativa están asociadas con genes involucrados en el metabolismo de compuestos aromáticos, biosíntesis y transporte de aminoácidos y metabolismo de purinas y de carbohidratos. Se ha reportado que mutantes auxótrofas de aminoácidos no esenciales como alanina, prolina y asparagina presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y células epiteliales humanas HeLa (**Popp et al., 2015**). No nos pareció extraño que mutantes de genes relacionados con la biosíntesis de estos aminoácidos aparecieran en nuestro análisis ya que el medio de cultivo DMEM carece de los aminoácidos alanina, asparagina, aspartato, glutamato y prolina (**Popp et al., 2015**). Así, la utilización de aminoácidos como fuente de carbono sería relevante para establecer un nicho replicativo intracelular.

Además, encontramos mutantes de genes que codifican reguladores globales que participan en la respuesta a estímulos externos, como por ejemplo *barA*, *arcA* y *rscC*. El gen *barA* codifica el sensor quinasa del sistema de dos componentes SirA/BarA. Este sistema regula la expresión de RNAs no codificantes del sistema Csr (asociado a almacenaje de carbono), genes de la isla SPI-1 y de genes asociados a motilidad y formación de biopelículas (**Teplitzki et al., 2003**). Por otra parte *arcA* codifica un factor transcripcional que participa como regulador de respuesta del sistema de dos componentes ArcA/ArcB. Este sistema se activa en respuesta a carencia de O_2 en el ambiente y regula la expresión de varios genes en condiciones anaeróbicas. Entre ellos, se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo energético, la biosíntesis del flagelo, la motilidad y el largo de cadena del AgO (**Evans et al., 2011; Silva-Valenzuela et al., 2016**). También encontramos el gen *rscC* que codifica un sensor quinasa ubicado en la membrana

citoplasmática que sensa perturbaciones en la membrana externa y periplasma. Cuando estas perturbaciones se manifiestan, RcsC se autofosforila y transfiere un grupo fosforilo a RcsD, el cual traspasa este grupo al regulador de respuesta RcsB. RcsB puede unirse al DNA formando homodímeros o heterodímeros con la proteína RcsA **(Laubacher and Ades, 2008)**. RcsAB activa la transcripción de genes que codifican proteínas requeridas para la síntesis del ácido colánico necesaria para la formación de una cápsula de exopolisacárido por fuera de la membrana externa de la bacteria. Se ha reportado que el gen *rscC* de *S. Typhimurium* se expresa dentro de macrófagos y otorgaría resistencia a péptidos antimicrobianos como polimixina B **(Detweiler et al., 2003)**.

Por otra parte, encontramos bajo selección negativa a los genes *tatB* y *tatC* que conforman el operón *tatABC*. Este operón codifica el sistema de secreción de proteínas *Twin-Arginine*, responsable del transporte de proteínas plegadas desde el citoplasma hacia el periplasma bacteriano. Las proteínas secretadas por el sistema Tat poseen un péptido señal en su extremo N-terminal (S/TRRXFLK), que es reconocido por las proteínas TatB y TatC ubicadas en la membrana plasmática de la bacteria. Este reconocimiento induce la polimerización de la proteína transmembrana TatA, permitiendo la secreción de las proteínas plegadas hacia el periplasma **(Palmer and Berks, 2012)**. El rol de este sistema en la patogenicidad de *Salmonella* ha sido estudiado en modelos murinos y en macrófagos. Se ha reportado que la mutante Δ *tatC* de *S. Typhimurium* presenta defectos en la colonización sistémica en ratones BALB/c inoculados por vía intraperitoneal **(Reynolds et al., 2011)**. En este mismo estudio, comprobaron que la mutante Δ *tatC* sobrevive igual que la cepa silvestre luego de 24 h post-infección en macrófagos murinos J774A.1. Los autores indican que, a pesar que la mutante se internalice menos que la cepa silvestre, las bacterias no tendrían defectos en su supervivencia intracelular. Considerando que nuestro análisis masivo se realizó luego de 6 h de infección, es probable que el sistema Tat sea necesario sólo en etapas tempranas de infección en macrófagos murinos. Adicionalmente, en nuestro análisis encontramos genes que codifican proteínas secretadas a través del sistema Tat, como *amiC* y *amiB*, que codifican enzimas N-acetilmuramil-L-alanina amidasa que rompen el enlace entre la L-alanina

y el residuo N-acetilmuramil del peptidoglican. Estas enzimas son esenciales para la división del septum durante el proceso de división celular (**Heidrich et al., 2001**). Es probable que estos genes sean necesarios para la replicación intracelular del patógeno. Además, se ha reportado que las mutantes $\Delta amiC$ de *S. Typhimurium* y *E. coli* son extremadamente susceptibles a agentes antimicrobianos como protamina, vancomicina y magainina 2, de igual manera que una mutante $\Delta tatC$ (**Weatherspoon-Griffin et al., 2011**). Hasta el momento, no se ha reportado el rol de estas enzimas en la división celular del patógeno dentro de macrófagos murinos.

Además, encontramos bajo selección negativa la mutante del gen *pgtE*, que codifica una proteasa que pertenece a la familia de las endopeptidasas de la membrana externa (omptinas). Se ha descrito que la mutante $\Delta pgtE$ de *S. Typhimurium* es muy sensible a los péptidos catiónicos antimicrobianos C18G, LL-37 (humano) y CRAMP (ratón) (**Guina et al., 2000**). Al complementar la mutante $\Delta pgtE$ con el gen silvestre clonado en un plasmidio de alto número de copias, se observó que la bacteria se volvió extremadamente resistente a los péptidos C18G y LL-37. Asimismo, en análisis transcriptómicos de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos J774A.1 se observó que el gen *pgtE* se encuentra sobre-expresado luego de 4 h de infección (**Eriksson et al., 2003**). Estos resultados sugieren que la proteasa PgtE sería necesaria para proteger a la bacteria contra la acción de péptidos antimicrobianos, uno de los principales mecanismos de muerte bacteriana presente en macrófagos.

Por otra parte, estudios han revelado que la acción de esta proteasa está fuertemente influida por el LPS. El LPS es una estructura que se ubica en la cara externa de la membrana externa de las bacterias Gram negativo y está conformada por 3 regiones: AgO, el oligosacárido core (interno y externo) y el lípido A, que representa la región más interna del LPS. Se ha reportado que la presencia de un AgO corto sería clave para la actividad proteolítica de PgtE (**Lahteenmaki et al., 2005**). Los autores demostraron que la actividad proteolítica de PgtE depende de un LPS corto (fenotipo rugoso) para poder inhibir a la antiproteasa $\alpha 2$ -antiplasmina ($\alpha 2AP$), responsable de inhibir a la serina proteasa plasmina. Al inhibir a la

antiproteasa α 2AP, la plasmina es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular permitiendo la migración de células como monocitos y macrófagos hacia los tejidos. De esta manera, la proteína PgtE contribuiría a la diseminación sistémica de *Salmonella* en el hospedero. Este fenómeno también se observó en lisados de bacterias provenientes de macrófagos J774A.1, donde existe una mayor expresión de *pgtE* e inducción de modificaciones en el LPS (**Lahteenmaki et al., 2005**).

En concordancia a lo anterior, en nuestro análisis a escala genómica también encontramos mutantes de genes relacionados con la biosíntesis y modificaciones del LPS. Entre ellos, encontramos genes del operón *waa* (*rfa*) asociados a la biosíntesis del core externo (*waaK*, *waaB*, *waal*, *waaJ*, *waaZ* y *waaL*), genes del operón *wba* (*rfb*) relacionados con la biosíntesis del AgO (*wbaP*, *wbaN*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaDC* y *oafA*), genes que codifican reguladores del largo de cadena del AgO (como el gen *wzz_{tepE}*, asociado al largo de cadena VL-AgO) y genes asociados a modificaciones covalentes del LPS como *arnT* (*pmrK*), que codifica una transferasa que cataliza la adición preferencial de α -L-Ara4N al grupo 4'-fosfato del lípido A (**Figura 17**). Esta modificación ocurre en la región periplasmática de la bacteria. El rol de esta modificación en los fosfatos del lípido A se ha asociado a una mayor resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos como polimixina B, ya que reducen la carga aniónica de la membrana externa de la bacteria (**Ernst et al., 1999**). Además, se ha reportado que esta modificación ocurren en *S. Typhimurium* cuando se encuentra dentro de la SCV en macrófagos murinos RAW264.7 (**Gibbons et al., 2005**). Esta misma modificación se observó al crecer la bacteria *in vitro* en medio con cantidades limitantes de Mg^{+2} y pH ácido, condiciones similares a las existentes dentro macrófagos (**Gibbons et al., 2005**). De esta manera, la modificación de la estructura del LPS permite a la bacteria resistir el ataque de las defensas del sistema inmune innato.

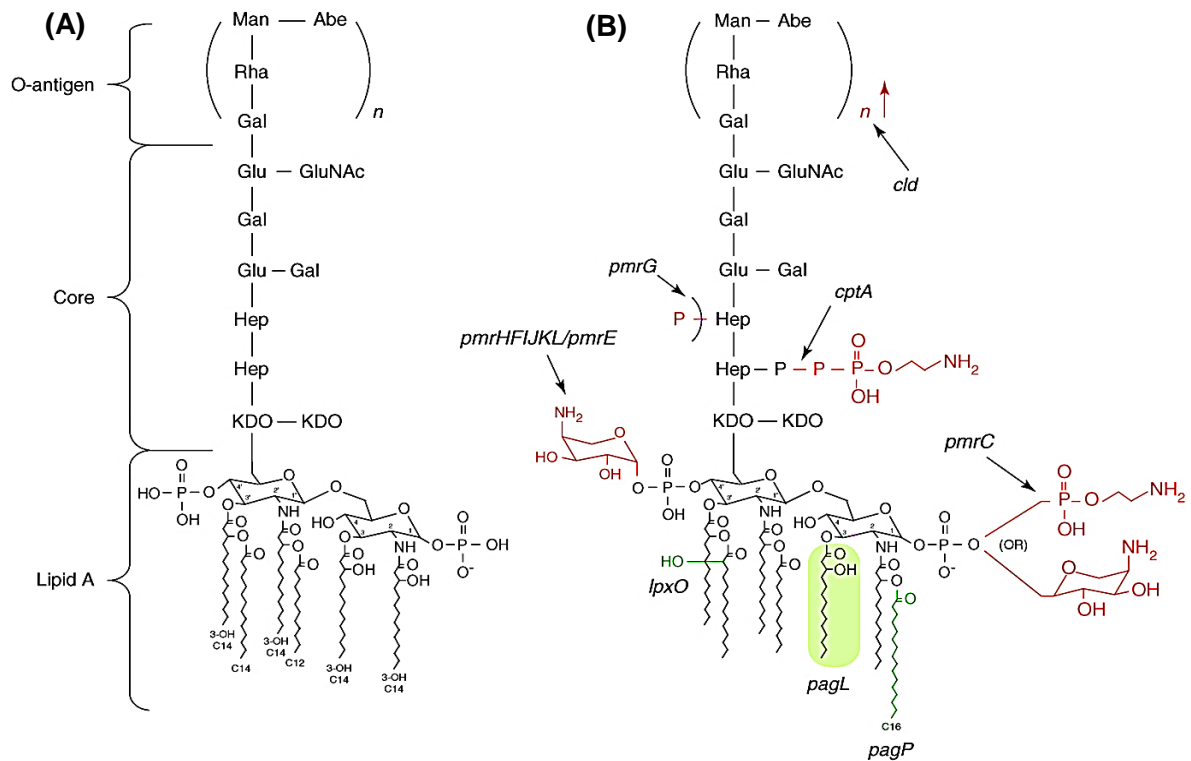


Figura 17.- Estructura del LPS de *S. Typhimurium* y sus modificaciones. (A) LPS no modificado que se obtiene predominantemente en medio rico (medio LB). **(B)** Modificaciones del LPS *in vivo*. El LPS puede ser modificado por mecanismos relacionados con el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (mostrados en verde) y por mecanismos regulados por el sistema de dos componentes PmrA/PmrB (mostrados en rojo). Específicamente, se destaca la modificación mediada por las proteínas codificadas en el operón *arnBCADTEF* (*pmrHFIJKL/pmrE*) responsable de la adición de un grupo 4-aminoarabinosa en el fosfato de la posición 4' del dímero de glucosamina del lípido A. Esta modificación también puede ser añadida en el fosfato de la posición 1' del lípido A. Finalmente, destaca la modificación en el AgO a cargo del producto de los genes *wzz* (*cld*), los cuales determinan el largo preferencial de cadena del AgO. Las mutantes de los genes mencionados presentaron selección negativa en nuestro análisis a escala genómica en macrófagos murinos (Extraído de **Gunn et al., 2008**).

Con el propósito de identificar un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* requerido para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*, se realizó un análisis comparativo a partir de la base de datos de genes requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos RAW264.7 generada en esta tesis y la base de datos de genes requeridos para la supervivencia intracelular en *D. discoideum* obtenida en nuestro laboratorio (Memoria

de Título de Bioquímico de Bayron Labra, 2018). Ambas bases de datos se alinearon y se determinó el conjunto común de mutantes que presentaron defectos en la supervivencia intracelular de acuerdo a los criterios mencionados en la sección 5.10.1 de Materiales y Métodos. En conjunto, nuestro análisis comparativo permitió identificar mutantes en 213 genes de *S. Typhimurium* que presentaron defectos en la supervivencia intracelular tanto en macrófagos murinos RAW264.7 como en la ameba *D. discoideum*. La lista completa de genes se muestra en la **Tabla B** de la sección Anexos.

Al realizar el análisis comparativo, observamos la pérdida de mutantes en genes codificados en islas de patogenicidad conservadas, como SPI-1 y SPI-3. En la literatura se ha estudiado el rol de la isla SPI-1 durante la interacción de *Salmonella* con diferentes amebas de vida libre; sin embargo, la importancia de SPI-1 en la supervivencia intracelular ha sido contradictoria. Se ha reportado que la mutante $\Delta spaS$ de *S. Typhimurium* no presenta defectos en la supervivencia intracelular en *A. polyphaga*, recuperándose bacterias intracelulares en cantidades similares a la cepa silvestre a las 1, 4, 24 y 48 h post-infección (**Bleasdale et al., 2009**). En cambio, resultados de nuestro laboratorio señalan que la isla SPI-1 de *S. Typhimurium* sería necesaria para sobrevivir dentro de la ameba *D. discoideum* por lo menos hasta 6 h post-infección (**Riquelme et al., 2016**).

Respecto a la isla SPI-3, encontramos bajo selección las mutantes de los genes *rhuM*, *misL*, *marT* y *mgtB*. De estos genes, el más descrito en la literatura es el operón *mgtCB*. El gen *mgtB* codifica una proteína transmembrana transportadora de Mg^{+2} que capta este ion desde la región periplasmática y lo moviliza hacia el citoplasma bacteriano (**Alix and Blanc-Potard, 2007**). El gen *mgtC* codifica una proteína transmembrana con función ATPasa que regula el potencial de membrana de la bacteria (**Gunzel et al., 2006**). Ambos genes están bajo el control del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, donde el sensor PhoQ se autofosforila en respuesta a bajas concentraciones de Mg^{+2} , pH ácido o presencia de péptidos antimicrobianos en el medio. De esta manera, transfiere el grupo fosforilo al regulador de respuesta PhoP, que se une a regiones promotoras de múltiples genes,

incluyendo el promotor de *mgtC* (**Alix and Blanc-Potard, 2007**). En la literatura se ha reportado que los genes *mgtB* y *mgtC* se sobre-expresan dentro del protozoo *Tetrahymena*, indicando que este operón sería importante para que *Salmonella* se mantenga en vacuolas digestivas dentro de este protozoo (**Rehfuss et al., 2011**). Por otro lado, mutantes nulas de los genes *mgtB* y *mgtC* de *S. Typhimurium* presentan defectos en la virulencia en ratones, así como en la supervivencia en medios con cantidades limitantes de Mg^{+2} y en el interior de macrófagos (**Blanc-Potard and Groisman, 1997**). Además, en análisis transcriptómicos de *S. Typhimurium* se ha observado que los genes *mgtB* y *mgtC* se sobre-expresan en el interior de macrófagos RAW264.7 luego de 8 h de infección (**Srikumar et al., 2015**). Los datos obtenidos en nuestro análisis comparativo concuerdan con lo reportado en la literatura, donde el gen *mgtB* (y posiblemente los otros genes que componen la isla SPI-3) serían relevantes para crear un nicho replicativo dentro de macrófagos murinos y amebas.

Dentro de los genes relacionados con la respuesta bacteriana a variaciones en el medio ambiente, en nuestro análisis encontramos mutantes en el gen *spoT*, que codifica la enzima SpoT encargada de la síntesis de la alarmona (p)ppGpp y de su hidrólisis a GTP/GDP. La síntesis de (p)ppGpp mediante SpoT se induce en condiciones de hambruna de fuentes de carbono, ácidos grasos, fosfato y hierro. Sin embargo, existe otra enzima encargada de sintetizar (p)ppGpp denominada RelA. Esta enzima detecta condiciones limitantes de aminoácidos y de shock por calor (**Hauryliuk et al., 2015**). La producción de (p)ppGpp induce la reprogramación global de procesos bacterianos como transcripción, replicación y traducción, permitiendo la adaptación de la bacteria a estas condiciones (**Srivatsan and Wang, 2008**). Estos cambios fisiológicos frente a condiciones de estrés se conoce como la “respuesta estricta” (“*stringent response*”). Por otra parte, se ha reportado que (p)ppGpp controla la expresión de genes de las islas SPI-1 a SPI-5 y del plasmidio de virulencia de *Salmonella* a través de sus reguladores transcripcionales (HilA, InvF, RtsA, SsrA, SlyA y SpvR), indicando que la alarmona tendría un rol fundamental en la virulencia de *Salmonella* (**Thompson et al., 2006**). Además, los autores reportaron que la doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ presenta defectos en la supervivencia intracelular en

macrófagos murinos J774A.1 luego de 24 h de infección. Estos datos concuerdan con nuestras observaciones en macrófagos murinos, donde las mutantes de los genes *spoT* y *relA* mostraron defectos en la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium*. Por otra parte, también encontramos bajo selección negativa la mutante del gen *adiY* que codifica un factor transcripcional asociado a la respuesta adaptativa a estrés ácido. AdiY es un factor transcripcional que activa la expresión del gen *adiA*. Este gen codifica una arginina descarboxilasa citoplasmática que convierte la arginina en agmatina consumiendo un protón del medio intracelular. Por lo tanto, aumenta el pH dentro de la bacteria en respuesta a un estrés ácido (**Alvarez-Ordonez et al., 2010**). Estos resultados sugieren que *Salmonella* se enfrenta a situaciones de estrés similares dentro de macrófagos y amebas, por lo que requeriría estos genes para lograr adaptarse y sobrevivir en estos ambientes.

Finalmente, una de las categorías funcionales que tuvo mayor representatividad en nuestro análisis comparativo se relacionó con genes involucrados en la biosíntesis y modificaciones del LPS. Entre ellos, se encontraron genes asociados a la síntesis del core externo (*waaB*, *waaI*, *waaJ*, *waaL* y *waaZ*), genes asociados a la síntesis del AgO (*wbaC*, *wbaK*, *wbaM*, *wbaN*, *wbaD* y *oafA*) y genes asociados a la regulación del largo de cadena del AgO (*wzz_{lepE}*). Se ha reportado que tanto el core como el AgO de *S. Typhimurium* son necesarios para la motilidad bacteriana, para resistir la acción de detergentes (DOC), péptidos antimicrobianos (polimixina B) y componentes del suero humano y para la colonización sistémica en ratones infectados oralmente (**Kong et al., 2011**). De este modo, el LPS cumple un rol fundamental en la respuesta adaptativa frente a condiciones ambientales adversas como pH ácido, variaciones de oxígeno, péptidos antimicrobianos y proteínas del complemento con actividad bactericida en hospederos mamíferos. Sin embargo, la contribución del LPS en la interacción con amebas no ha sido estudiada en profundidad. En la literatura se ha descrito que *D. discoideum* tratado previamente con LPS o lípido A comercial de *E. coli* mejora el *clearance* bacteriano intracelular de bacterias Gram positivo como *S. aureus* (**Walk et al., 2011**). Por otra parte, en la ameba *Entamoeba histolytica* se han encontrado diferentes isoformas de un péptido antimicrobiano denominado amebaporo, capaz de

formar poros que afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivo y Gram negativo (**Leippe, 1999**). Particularmente, al analizar la actividad bactericida de estas isoformas frente a distintas bacterias se observó que una cepa con LPS defectuoso de *E.coli* K12 (D31) necesitaba una menor concentración de estos péptidos para inhibir su crecimiento en comparación con una cepa silvestre de *E.coli* K12 (**Andra et al., 2003**). De esta manera, el LPS podría ser relevante para combatir la acción de péptidos antimicrobianos presente en amebas.

Debido a que varias mutantes de *S. Typhimurium* asociados al LPS se encontraron bajo selección negativa en macrófagos murinos y en *D. discoideum*, sumado a que existe poca información sobre el rol del LPS en la supervivencia intracelular de *Salmonella* en amebas, se escogieron mutantes de esta categoría para corroborar los resultados de nuestro análisis comparativo mediante ensayos de competencia *in vitro* en ambos modelos. En estos ensayos evaluamos la contribución de los genes en estudio en los procesos de internalización y supervivencia intracelular. Es importante mencionar que los resultados obtenidos a partir de nuestros análisis de mutantes a escala genómica son sólo predicciones, debido a la presencia de posibles efectos polares generados por la inserción del transposón en las mutantes analizadas. Por esta razón, es necesario comprobar cualquier fenotipo interesante en los modelos estudiados mediante la construcción y análisis de mutantes individuales y mutantes complementadas con el gen de interés.

De esta manera, se escogió el gen *waaL*, cuya mutante se encontró bajo selección negativa en ambos modelos. El gen *waaL* codifica una ligasa ubicada en la membrana interna de la bacteria cuya función es unir el AgO al *core* externo del lípido A. Se ha reportado que la mutante $\Delta waaL$ de *S. Typhimurium* (que sólo contiene lípidoA-*core* y un fenotipo rugoso) presenta defectos en la movilidad y una menor resistencia a polimixina B y proteínas del complemento (**Holzer et al., 2009**). En ese mismo trabajo observaron que la mutante $\Delta waaL$ era fagocitada tres veces más que la cepa silvestre en macrófagos murinos. Esta observación se contrapone a nuestros resultados en ensayos de competencia *in vitro* en macrófagos murinos RAW264.7. Nuestros datos muestran que la mutante $\Delta waaL$ se internaliza tres veces

menos que la cepa silvestre, indicando que la presencia del AgO sería necesaria para un adecuado reconocimiento entre *Salmonella* y macrófagos. Una posible explicación a las diferencias encontradas podría deberse a la forma en la que se realizaron los ensayos. En la publicación de **Holzer et al., 2009**, se realizaron ensayos de infección simple donde el contacto bacteria-célula fue sincronizada mediante centrifugación, favoreciendo la internalización bacteriana. Nuestros ensayos no incluyeron esta etapa de centrifugación por lo que es probable que la baja internalización obtenida por la mutante $\Delta waaL$ se deba a su defecto en la movilidad (**Holzer et al., 2009**), dificultando su llegada a la profundidad del pocillo donde se encuentran los macrófagos adheridos. Respecto a la supervivencia, también observamos diferencias con la literatura. La mutante $\Delta waaL$ presentó defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos a las 6 y 20 h post-infección similares a los presentados por la cepa atenuada $\Delta aroA$. Por otra parte, en la ameba *D. discoideum* observamos el mismo fenómeno en la internalización y en la supervivencia que en macrófagos murinos. Estos resultados nos indican que el AgO contribuiría a la internalización y supervivencia de *S. Typhimurium* en ambas células fagocíticas. Para confirmar que la funcionalidad de este gen sea responsable del fenotipo observado en la mutante, es necesario realizar ensayos con la cepa complementadas en *trans* con el gen silvestre en cuestión.

Otro grupo de genes que se escogió corresponde al operón *arnBCADTEF*, ya que observamos selección negativa para la mutante $\Delta arnT$ en macrófagos murinos y para las mutantes $\Delta arnA$, $\Delta arnE$ y $\Delta arnF$ en *D. discoideum*. Este operón está involucrado en la biosíntesis de undecaprenilfosfato- α -L-4-aminoarabinosa y la transferencia del grupo 4-aminoarabinosa al lípido A (**Figura 17**). Esta modificación en el LPS está regulada por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB. El sistema de dos componentes PmrA/PmrB (también llamado sistema BasR/BasS) está compuesto por el sensor PmrB, proteína anclada a la membrana interna de la bacteria cuyo dominio periplasmático es capaz de detectar altos niveles de Fe^{+3} y Al^{+3} *in vitro*, así como pH ácido. En respuesta a estas señales, PmrB se autofosforila y posteriormente transfiere el grupo fosforilo a PmrA, que actúa como factor de transcripción de múltiples genes, entre ellos el operón *arnBCADTEF*. Por

otro lado, PhoP/PhoQ regula indirectamente esta modificación a través de PmrD, proteína que es capaz de unirse a PmrA, estabilizando su estado fosforilado (**Figura 18**) (**Gunn, 2008**). Se ha reportado que mutantes nulas de los genes de este operón presentan una mayor susceptibilidad a polimixina B, a proteínas del complemento de suero humano y una menor supervivencia en macrófagos murinos RAW264.7 cuando la bacteria se crece en concentraciones bajas de Mg^{+2} (**Farizano et al., 2012**). Nuestros resultados señalan que la mutante $\Delta arnBCADTEF$ presenta defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos y en la ameba *D. discoideum*. Estos datos sugieren que la adición de 4-animoarabinosa al lípido A del LPS contribuye a la supervivencia y no a la internalización de *S. Typhimurium* en ambas células fagocíticas.

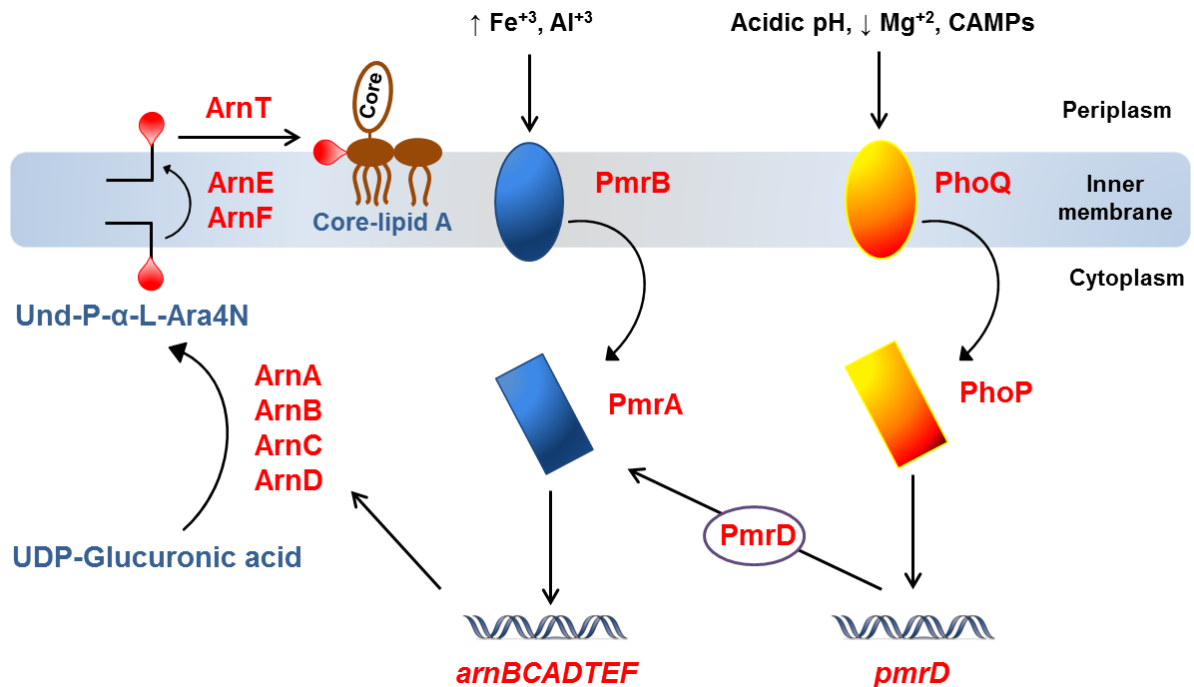


Figura 18. Regulación de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de undecaprenilfosfato-L-Ara4N y la transferencia del grupo L-Ara4N al lípido A del LPS de *S. Typhimurium*. La biosíntesis y la adición de L-Ara4N al lípido A está regulada por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB. Ambos sistemas detectan cambios en las condiciones ambientales (pH ácido, baja concentración de Mg^{+2} y alta concentración de Fe^{3+} y Al^{+3} , respectivamente) culminando en la activación del factor transcripcional PmrA. PmrA promueve la transcripción del operón *arnBCADTEF*, el cual contiene 7 genes responsables de la biosíntesis y adición del grupo L-Ara4N al lípido A. Las proteínas ArnA, ArnB, ArnC y ArnD convierten el ácido UDP-glucurónico a undecaprenilfosfato L-Ara4N (Und-P- α -L-Ara4N) en la región citoplasmática de la membrana interna. Por otra parte, las proteínas ArnE y ArnF transportan el Und-P- α -L-Ara4N a la región periplasmática de la membrana interna, donde la proteína de membrana ArnT transfiere el motivo L-Ara4N (mostrado en rojo) al lípido A-core. Modificado de **Wang and Quinn, 2010**.

Finalmente, analizamos la contribución de los distintos largos de cadena del AgO en la internalización y supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en ambos modelos, utilizando mutantes de los genes wzz_{ST} y wzz_{fepE} . Ambos genes son responsables de regular el largo de cadena del AgO, modulando el grado de polimerización de este antígeno, cuyo monómero corresponde a un oligosacárido compuesto por galactosa, ramnosa y manosa. De esta manera, el producto del gen wzz_{ST} modula la distribución modal L-AgO que contiene entre 16 a 35 unidades de oligosacárido mientras que wzz_{fepE} modula la forma VL-AgO agregando más de 100 unidades. Estos genes también son directamente regulados por el sistema de dos componentes PmrA/PmrB (**Murray et al., 2003**). En la literatura se ha reportado que la resistencia a proteínas del complemento depende del origen del suero. Por ejemplo, la mutante Δwzz_{ST} de *S. Typhimurium* es bastante resistente al efecto lítico de suero humano mientras que la mutante Δwzz_{fepE} es muy sensible (**Bravo et al., 2008**). En cambio, en magainin (**Murray et al., 2006**). Notablemente, la mutante doble de estos genes resultó ser muy susceptible a las proteínas del complemento de suero de cobayo (**Murray et al., 2006**). A pesar de estas discrepancias, no hay duda que el AgO otorga protección frente a proteínas del complemento. Por otra parte, se ha descrito que cepas mutantes nulas de los genes que codifican ambos reguladores presentan defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos J774-A.1 a tiempos cortos de infección (2 h). Esta observación cambia en el caso de la mutante Δwzz_{ST} , la que alcanza una supervivencia similar a la cepa parental a tiempos tardíos de infección (**Pescaretti et al., 2011**). En cambio, resultados publicados por **Holzer et al., 2009**, señalan que las mutantes Δwzz_{ST} y Δwzz_{fepE} se internalizan y sobreviven igual que la cepa silvestre en macrófagos murinos RAW264.7. Nuestros resultados muestran que sólo la mutante Δwzz_{ST} presenta defectos en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos a las 20 h post-infección. Una posible explicación a estas diferencias se podría atribuir a las condiciones experimentales en las que se realizan los ensayos. En la publicación de **Pescaretti et al., 2011**, las bacterias se crecieron en condiciones inductoras de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB, mientras que en esta tesis las bacterias fueron

cultivadas en medio LB. Por otro lado, en los ensayos publicados por **Hölzer et al., 2009**, las bacterias y células se sincronizaron mediante centrifugación.

En los ensayos realizados en la ameba *D. discoideum* se observó el mismo fenotipo en la cepa mutante Δwzz_{ST} , la cual presentó defectos en la supervivencia intracelular a las 6 h post-infección. Se observó que el grado de atenuación de esta mutante es más acentuado en la ameba que en macrófagos, obteniéndose ~9 veces menos bacteria que la cepa silvestre. En conclusión, los datos obtenidos en los ensayos de competencia con las mutantes individuales de estos reguladores en ambos modelos no se correlacionaron con los datos del análisis comparativo, donde encontramos bajo selección negativa sólo la mutante del gen wzz_{fepE} . Este fenómeno se podría explicar ya que las mutantes por transposición utilizadas en el análisis masivo pueden presentar efectos polares sobre genes río arriba o río abajo del gen que posee la inserción. De este modo, el defecto observado en la mutante wzz_{fepE} podría estar asociado a una mutación del gen anterior que afecte el marco de lectura del gen wzz_{fepE} o podría relacionarse con una mutación en la región 3' del gen, obteniendo una funcionalidad parcial del gen. Para poder confirmar estos resultados, sería pertinente realizar ensayos de complementación con el gen que presentó un fenotipo distinto en los ensayos de competencia (wzz_{ST}) y observar una restauración del fenotipo similar al de la cepa silvestre. Así podríamos confirmar que la presencia del L-AgO sería necesaria para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* dentro de ambas células fagocíticas.

Resumiendo, los genes *waaL*, *arnBCADTEF* y wzz_{ST} serían necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7 y la ameba *D. discoideum*. Una vez dentro de células fagocíticas, *Salmonella* se enfrenta a diversos mecanismos de degradación bacteriana, destacándose los péptidos catiónicos antimicrobianos. En macrófagos se ha descrito la presencia de defensinas y catelicidinas, péptidos capaces de generar poros en la membrana citoplasmática de las bacterias. De igual manera, *Salmonella* podría enfrentarse a moléculas similares en amebas, denominadas amebaporos, cuyo mecanismo de acción es semejante a los péptidos catiónicos antimicrobianos presentes en macrófagos y neutrófilos

(Leippe, 1999). Por lo tanto, la presencia de un LPS con un AgO completo que presente una distribución modal L-AgO y modificaciones como L-Ara4N en el lípido A podrían contribuir a la resistencia bacteriana frente a péptidos antimicrobianos de ambas células fagocíticas (**Figura 19**).

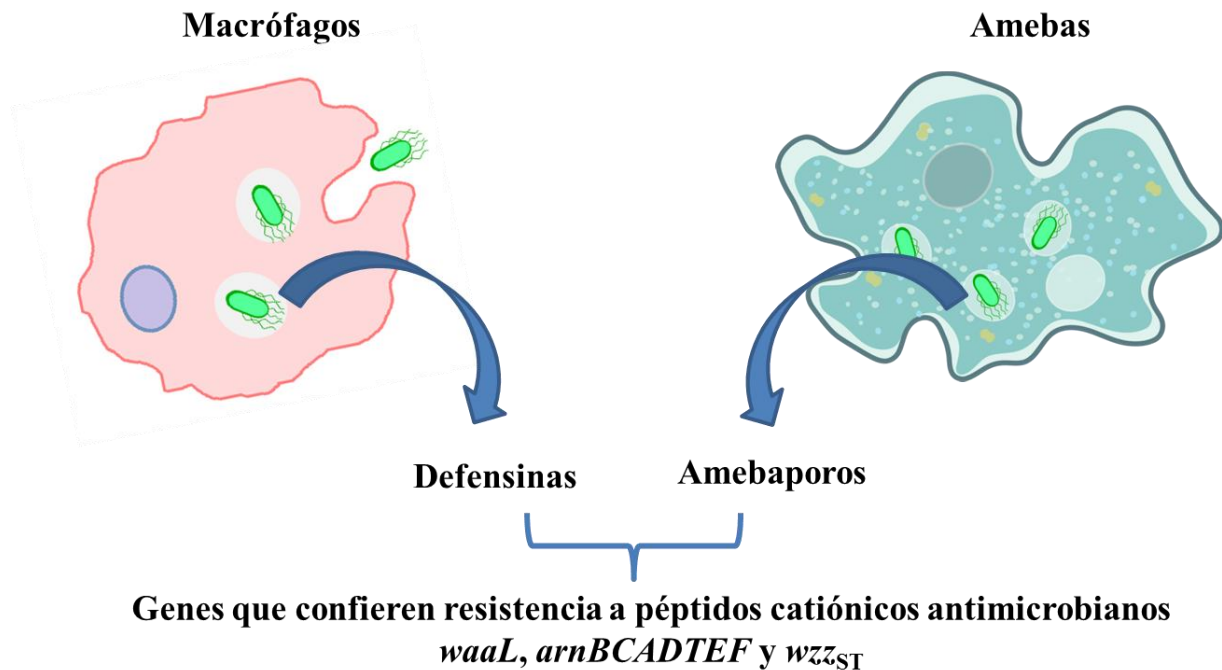


Figura 19.- Contribución de los genes *waaL*, *arnBCADTEF* y *wzz_{ST}* a la resistencia bacteriana frente a péptidos catiónicos antimicrobianos producidos por macrófagos y amebas.

Finalmente, en esta tesis realizamos un análisis a nivel genómico para identificar genes de *S. Typhimurium* involucrados en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos. Esta estrategia nos permitió obtener predicciones para genes no esenciales de *Salmonella*, obteniendo datos para genes que se han reportado previamente en la literatura y genes para los que no se ha establecido un rol en la supervivencia en macrófagos. A partir de la comparación de los genes requeridos para la supervivencia intracelular en ambos modelos, pudimos identificar un conjunto común de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y *D. discoideum*, validando la hipótesis propuesta en esta tesis. Entre ellos encontramos varios genes que se han relacionado con la

supervivencia en células del sistema inmune pero que no habían sido asociados con la supervivencia intracelular en amebas. De manera adicional, confirmamos las predicciones de nuestro análisis comparativo a escala genómica utilizando diferentes mutantes relacionadas con la biosíntesis y modificación del LPS. Estos resultados sugieren que el LPS es una estructura fundamental que modularía la internalización y supervivencia intracelular de *Salmonella* en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*.

8.- CONCLUSIONES

- El protocolo diseñado para la generación de genotecas de secuenciación no permitió identificar mutantes de *S. Typhimurium* defectuosas en la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 utilizando la genoteca de mutantes por intercambio alélico SGD-K. Sin embargo, utilizando la genoteca de mutantes por inserción al azar de un derivado del transposón Tn5 logramos identificar mutantes en 719 genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7.
- Dentro de los genes identificados encontramos algunos codificados en islas de patogenicidad (SPI-1, SPI-2, SPI-3 y SPI-5), genes relacionados con el transporte y biosíntesis de aminoácidos y carbohidratos, genes que codifican reguladores globales, genes asociados a la respuesta bacteriana frente a diferentes tipos de estrés y genes necesarios para la biosíntesis y modificación del LPS.
- Adicionalmente, logramos identificar un conjunto común de 213 genes necesarios para la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos murinos RAW264.7 y en la ameba *D. discoideum*, confirmando la hipótesis propuesta en esa tesis. Entre ellos destacan genes codificados en islas de patogenicidad (SPI-1 y SPI-3), genes involucrados en la síntesis de carbohidratos, genes asociados a la respuesta bacteriana frente a estrés ácido y nutricional y genes vinculados a la biosíntesis y modificación del LPS.
- En ensayos de competencia *in vitro* en macrófagos murinos RAW264.7 y en *D. discoideum*, mutantes individuales de los genes *waaL* (que codifica la ligasa del AgO), operón *arnBCADTEF* (que codifica enzimas involucradas en la biosíntesis y transferencia de 4-aminoarabinosa al lípido A) y *wzz_{ST}* (que codifica el regulador del largo de cadena L-AgO) presentaron defectos en la supervivencia intracelular en ambos modelos. Estos resultados validan algunas de las predicciones obtenidas en nuestro análisis comparativo a escala genómica y demuestran la importancia del LPS en la patogenicidad de *Salmonella*.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Alix, E., and Blanc-Potard, A.B. (2007). MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol* 15(6), 252-256. doi: 10.1016/j.tim.2007.03.007.
- Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., and López, M. (2010). Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Int J Food Microbiol* 136(3), 278-282. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.024.
- Andra, J., Herbst, R., and Leippe, M. (2003). Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immunol* 27(4), 291-304.
- Blanc-Potard, A.B., and Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 16(17), 5376-5385. doi: 10.1093/emboj/16.17.5376.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J., and Groisman, E.A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 181(3), 998-1004.
- Bleasdale, B., Lott, P.J., Jagannathan, A., Stevens, M.P., Birtles, R.J., and Wigley, P. (2009). The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 75(6), 1793-1795. doi: 10.1128/AEM.02033-08.
- Bravo, D., Silva, C., Carter, J.A., Hoare, A., Alvarez, S.A., Blondel, C.J., et al. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J Med Microbiol* 57(Pt 8), 938-946. doi: 10.1099/jmm.0.47848-0.
- Brawn, L.C., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1(1), 63-75. doi: 10.1016/j.chom.2007.02.001.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., and Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30(1), 175-188.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62(8), 3254-3261.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., and Bermudez, L.E. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65(9), 3759-3767.

- Cosson, P., and Lima, W.C. (2014). Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? *Cell Microbiol* 16(6), 816-823. doi: 10.1111/cmi.12291.
- Chan, K., Kim, C.C., and Falkow, S. (2005). Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 73(9), 5438-5449. doi: 10.1128/IAI.73.9.5438-5449.2005.
- Chen, H.M., Wang, Y., Su, L.H., and Chiu, C.H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr Neonatol* 54(3), 147-152. doi: 10.1016/j.pedneo.2013.01.010.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640-6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.
- Desai, P.T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., et al. (2013). Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. *MBio* 4(2). doi: 10.1128/mBio.00579-12.
- Detweiler, C.S., Monack, D.M., Brodsky, I.E., Mathew, H., and Falkow, S. (2003). *virK*, *somA* and *rscC* are important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. *Mol Microbiol* 48(2), 385-400.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J.C. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47(1), 103-118.
- Ernst, R.K., Guina, T., and Miller, S.I. (1999). How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J Infect Dis* 179 Suppl 2, S326-330. doi: 10.1086/513850.
- Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 376, 1-34. doi: 10.1007/82_2013_351.
- Evans, M.R., Fink, R.C., Vazquez-Torres, A., Porwollik, S., Jones-Carson, J., McClelland, M., et al. (2011). Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiol* 11, 58. doi: 10.1186/1471-2180-11-58.
- Farizano, J.V., Pescaretti Mde, L., Lopez, F.E., Hsu, F.F., and Delgado, M.A. (2012). The PmrAB system-inducing conditions control both lipid A remodeling and O-antigen length distribution, influencing the *Salmonella* Typhimurium-host

- interactions. *J Biol Chem* 287(46), 38778-38789. doi: 10.1074/jbc.M112.397414.
- Fass, E., and Groisman, E.A. (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 12(2), 199-204. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.004.
- Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., and Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14), 5189-5193.
- Gao, L.Y., Harb, O.S., and Abu Kwaik, Y. (1997). Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* 65(11), 4738-4746.
- Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., and Wellington, E.M. (2003). Interactions between *Salmonella* Typhimurium and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol* 46(3), 358-369. doi: 10.1007/s00248-003-1001-3.
- Gibbons, H.S., Kalb, S.R., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2005). Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol* 55(2), 425-440. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04409.x.
- Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S.I. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 182(14), 4077-4086.
- Gunn, J.S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol* 16(6), 284-290. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.007.
- Gunzel, D., Kucharski, L.M., Kehres, D.G., Romero, M.F., and Maguire, M.E. (2006). The MgtC virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Bacteriol* 188(15), 5586-5594. doi: 10.1128/JB.00296-06.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and Miller, S.I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6(1), 53-66. doi: 10.1038/nrmicro1788.
- Haurlyuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13(5), 298-309. doi: 10.1038/nrmicro3448.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., et al. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell

- separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41(1), 167-178.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., and Holden, D.W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269(5222), 400-403.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., *et al.* (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30(1), 163-174.
- Holzer, S.U., Schlumberger, M.C., Jackel, D., and Hensel, M. (2009). Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 77(12), 5458-5470. doi: 10.1128/IAI.00871-09.
- Jackson, L.K., Nawabi, P., Hentea, C., Roark, E.A., and Haldar, K. (2008). The *Salmonella* virulence protein SifA is a G protein antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37), 14141-14146. doi: 10.1073/pnas.0801872105.
- King, C.H., Shotts, E.B., Jr., Wooley, R.E., and Porter, K.G. (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* 54(12), 3023-3033.
- Kong, Q., Yang, J., Liu, Q., Alamuri, P., Roland, K.L., and Curtiss, R., 3rd (2011). Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 79(10), 4227-4239. doi: 10.1128/IAI.05398-11.
- Lahteenmaki, K., Kyllonen, P., Partanen, L., and Korhonen, T.K. (2005). Antiprotease inactivation by *Salmonella enterica* released from infected macrophages. *Cell Microbiol* 7(4), 529-538. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00483.x.
- Laubacher, M.E., and Ades, S.E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190(6), 2065-2074. doi: 10.1128/JB.01740-07.
- Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., and Monack, D.M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2(2), e11. doi: 10.1371/journal.ppat.0020011.
- Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol* 23(4-5), 267-279.

- Link, A.J., Phillips, D., and Church, G.M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* 179(20), 6228-6237.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., *et al.* (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50(6), 882-889. doi: 10.1086/650733.
- Maloy, S.R. (1990). *Experimental Techniques in Microbial Genetics* Boston.
- Mazurkiewicz, P., Tang, C.M., Boone, C., and Holden, D.W. (2006). Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens. *Nat Rev Genet* 7(12), 929-939. doi: 10.1038/nrg1984.
- Meakins, S., Fisher, I.S., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape, H., Cormican, M., *et al.* (2008). Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist* 14(1), 31-35. doi: 10.1089/mdr.2008.0777.
- Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989). A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(13), 5054-5058.
- Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., and Falkow, S. (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18), 9833-9838.
- Morpeth, S.C., Ramadhani, H.O., and Crump, J.A. (2009). Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin Infect Dis* 49(4), 606-611. doi: 10.1086/603553.
- Murray, G.L., Attridge, S.R., and Morona, R. (2003). Regulation of *Salmonella Typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol* 47(5), 1395-1406.
- Murray, G.L., Attridge, S.R., and Morona, R. (2006). Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J Bacteriol* 188(7), 2735-2739. doi: 10.1128/JB.188.7.2735-2739.2006.
- Palmer, T., and Berks, B.C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10(7), 483-496. doi: 10.1038/nrmicro2814.
- Pescaretti, M., Lopez, F.E., Morero, R.D., and Delgado, M.A. (2011). The PmrA/PmrB regulatory system controls the expression of the wzz_{fepE} gene involved in the

- O-antigen synthesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 157(Pt 9), 2515-2521. doi: 10.1099/mic.0.050088-0.
- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J., and Gheesling, L.L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155(7), 568-570. doi: 10.1016/j.resmic.2004.04.005.
- Popp, J., Noster, J., Busch, K., Kehl, A., Zur Hellen, G., and Hensel, M. (2015). Role of host cell-derived amino acids in nutrition of intracellular *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 83(12), 4466-4475. doi: 10.1128/IAI.00624-15.
- Porwollik, S., Santiviago, C.A., Cheng, P., Long, F., Desai, P., Fredlund, J., *et al.* (2014). Defined single-gene and multi-gene deletion mutant collections in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *PLoS One* 9(7), e99820. doi: 10.1371/journal.pone.0099820.
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tukel, C., Akcelik, M., and Baumler, A.J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74(1), 19-27. doi: 10.1128/IAI.74.1.19-27.2006.
- Ramos-Morales, F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biology* 2012, 36.
- Reh fuss, M.Y., Parker, C.T., and Brandl, M.T. (2011). *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *ISME J* 5(2), 262-273. doi: 10.1038/ismej.2010.128.
- Reynolds, M.M., Bogomolnaya, L., Guo, J., Aldrich, L., Bokhari, D., Santiviago, C.A., *et al.* (2011). Abrogation of the twin arginine transport system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium leads to colonization defects during infection. *PLoS One* 6(1), e15800. doi: 10.1371/journal.pone.0015800.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M., and Finlay, B.B. (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. *J Exp Med* 186(4), 569-580.
- Riquelme, S., Varas, M., Valenzuela, C., Velozo, P., Chahin, N., Aguilera, P., *et al.* (2016). Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for *Salmonella Typhimurium* to Survive Intracellularly in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol* 7, 1305. doi: 10.3389/fmicb.2016.01305.
- Sabbagh, S.C., Forest, C.G., Lepage, C., Leclerc, J.M., and Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305(1), 1-13. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x.

- Sabbagh, S.C., Lepage, C., McClelland, M., and Daigle, F. (2012). Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *PLoS One* 7(5), e36643. doi: 10.1371/journal.pone.0036643.
- Salah, I.B., Ghigo, E., and Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 15(10), 894-905. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03011.x.
- Santiviago, C.A., Reynolds, M.M., Porwollik, S., Choi, S.H., Long, F., Andrews-Polymenis, H.L., et al. (2009). Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog* 5(7), e1000477. doi: 10.1371/journal.ppat.1000477.
- Segal, G., and Shuman, H.A. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* 67(5), 2117-2124.
- Silva-Valenzuela, C.A., Molina-Quiroz, R.C., Desai, P., Valenzuela, C., Porwollik, S., Zhao, M., et al. (2015). Analysis of Two Complementary Single-Gene Deletion Mutant Libraries of *Salmonella* Typhimurium in Intraperitoneal Infection of BALB/c Mice. *Front Microbiol* 6, 1455. doi: 10.3389/fmicb.2015.01455.
- Silva-Valenzuela, C.A., Velasquez, F., Penailillo, J., Garcias-Papayani, H., Fernandez, P., Tobar, P., et al. (2016). O-antigen chain-length distribution in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is regulated by oxygen availability. *Biochem Biophys Res Commun* 477(4), 563-567. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.074.
- Sillo, A., Matthias, J., Konertz, R., Bozzaro, S., and Eichinger, L. (2011). *Salmonella* typhimurium is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cell Microbiol* 13(11), 1793-1811. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01662.x.
- Skriwan, C., Fajardo, M., Hagele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., et al. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol* 291(8), 615-624. doi: 10.1078/1438-4221-00177.
- Srikumar, S., Kroger, C., Hebrard, M., Colgan, A., Owen, S.V., Sivasankaran, S.K., et al. (2015). RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog* 11(11), e1005262. doi: 10.1371/journal.ppat.1005262.
- Srivatsan, A., and Wang, J.D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* 11(2), 100-105. doi: 10.1016/j.mib.2008.02.001.

- Steinert, M. (2011). Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 22(1), 70-76. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.11.003.
- Steinert, M., Leippe, M., and Roeder, T. (2003). Surrogate hosts: protozoa and invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *Int J Med Microbiol* 293(5), 321-332. doi: 10.1078/1438-4221-00275.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., and Koonin, E.V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28(1), 33-36.
- Teplitski, M., Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2003). Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 185(24), 7257-7265.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungstrom, M., Winiacka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., and Rhen, M. (2004). Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Appl Environ Microbiol* 70(6), 3706-3714. doi: 10.1128/AEM.70.6.3706-3714.2004.
- Thompson, A., Rolfe, M.D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J.C., and Tedin, K. (2006). The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* 281(40), 30112-30121. doi: 10.1074/jbc.M605616200.
- Tuompo, R., Hannu, T., Mattila, L., Siitonen, A., and Leirisalo-Repo, M. (2013). Reactive arthritis following *Salmonella* infection: a population-based study. *Scand J Rheumatol* 42(3), 196-202. doi: 10.3109/03009742.2012.739201.
- Vazquez-Torres, A., and Fang, F.C. (2001). *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect* 3(14-15), 1313-1320.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C., et al. (2000). *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287(5458), 1655-1658.
- Walk, A., Callahan, J., Srisawangvong, P., Leuschner, J., Samaroo, D., Cassilly, D., et al. (2011). Lipopolysaccharide enhances bactericidal activity in *Dictyostelium discoideum* cells. *Dev Comp Immunol* 35(8), 850-856. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.018.
- Wang, X., and Quinn, P.J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* 49(2), 97-107. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.002.

Weatherspoon-Griffin, N., Zhao, G., Kong, W., Kong, Y., Morigen, Andrews-Polymeris, H., *et al.* (2011). The CpxR/CpxA two-component system up-regulates two Tat-dependent peptidoglycan amidases to confer bacterial resistance to antimicrobial peptide. *J Biol Chem* 286(7), 5529-5539. doi: 10.1074/jbc.M110.200352.

10.- ANEXOS

Tabla A. Lista de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7. Parámetros de selección: $\text{Log}_2(T_6/T_0) \leq -1$; $P \leq 0,05$ y M: número de mutantes por gen.

Locus_Tag	Gen	Descripción o Función	$\text{Log}_2(T_6/T_0)$	P	M	COGs
STM14_0003	<i>thrB</i>	homoserine kinase	-1,30	0,05	3	E
STM14_0004	<i>thrC</i>	threonine synthase	-1,25	0,04	3	E
STM14_0016	-	putative transcriptional regulator	-4,33	0,01	6	-
STM14_0022	-	putative exochitinase	-4,79	0,02	3	-
STM14_0023	-	putative hydroxymethyltransferase	-4,92	0,01	5	-
STM14_0041	-	putative arylsulfatase	-5,85	0,04	18	-
STM14_0042	-	putative 5'-nucleotidase	-7,20	0,04	3	-
STM14_0043	-	putative outer membrane/exported protein	-7,88	0,04	7	-
STM14_0044	-	putative arylsulfatase	-1,73	0,00	4	-
STM14_0045	<i>aslB</i>	putative arylsulfatase regulator	-1,45	0,02	3	P
STM14_0047	-	putative arylsulfatase	-10,61	0,03	6	-
STM14_0051	<i>xynT</i>	putative sodium galactoside symporter	-1,40	0,05	5	-
STM14_0060.R	-	hypothetical protein	-7,39	0,03	3	-
STM14_0061	<i>rihC</i>	ribonucleoside hydrolase RihC	-7,82	0,04	4	F
STM14_0062	<i>citB</i>	putative transcriptional regulator	-1,14	0,02	3	-
STM14_0063.J	<i>citA</i>	sensor kinase citA	-8,49	0,00	8	T
STM14_0067	-	putative citrate-sodium symporter	-1,15	0,01	3	-
STM14_0069	<i>citC2</i>	putative citrate lyase synthetase	-7,70	0,02	3	C
STM14_0078	<i>carB</i>	carbamoyl phosphate synthase large subunit	-5,01	0,02	7	E
STM14_0080	<i>tnpA_1</i>	transposase	-5,30	0,01	4	L
STM14_0083	<i>caiD</i>	carnitiny-CoA dehydratase	-1,20	0,00	3	I
STM14_0085.R	<i>caiB</i>	Crotonobetainyl-CoA:carnitine CoA-transferase	-5,84	0,03	3	C
STM14_0100	-	putative sulfatase	-5,88	0,01	13	-
STM14_0108	<i>apaG</i>	protein associated with Co^{2+} and Mg^{2+} efflux	-1,59	0,02	3	P
STM14_0114	<i>djlA</i>	DNA-J like membrane chaperone protein	-5,10	0,03	5	O
STM14_0116	<i>hepA</i>	ATP-dependent helicase HepA	-1,25	0,01	3	K
STM14_0118.LR	-	putative secreted protein	-8,16	0,01	3	-
STM14_0170	<i>hofC</i>	type IV pilin biogenesis protein	-1,70	0,02	3	N
STM14_0191	-	putative restriction endonuclease	-1,09	0,01	4	-
STM14_0202	<i>hpt</i>	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	-5,12	0,03	3	F
STM14_0216	<i>panB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-5,62	0,05	3	H
STM14_0226	<i>mrcB</i>	penicillin-binding protein 1b	-4,88	0,02	5	M
STM14_0248	<i>dgt</i>	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	-8,73	0,02	7	F
STM14_0249	<i>htrA</i>	serine endoprotease	-1,51	0,01	5	O
STM14_0275	-	putative endochitinase	-5,41	0,03	4	-

STM14_0276	<i>ldcC</i>	lysine decarboxylase 2	-5,59	0,03	4	E
STM14_0287	<i>metQ</i>	DL-methionine transporter substrate-binding subunit	-2,29	0,00	5	P
STM14_0297	<i>rriH</i>	Large Subunit Ribosomal RNA	-1,12	0,04	9	J
STM14_0323	-	putative cytoplasmic protein	-4,38	0,02	3	-
STM14_0333.J	-	lcmF-related protein	-4,74	0,03	3	U
STM14_0338	<i>vgrG</i>	putative cytoplasmic protein	-8,01	0,04	5	U
STM14_0341	-	putative RHS-like protein	-11,17	0,01	5	-
STM14_0351.R	-	Transposase	-1,37	0,03	3	X
STM14_0354	<i>safC</i>	putative fimbrial usher	-8,25	0,03	4	N
STM14_0384	-	putative permease	-11,17	0,04	3	-
STM14_0385	<i>leuC</i>	isopropylmalate isomerase large subunit	-3,73	0,01	3	E
STM14_0393	<i>stbD</i>	putative fimbrial usher	-5,48	0,02	5	-
STM14_0395	<i>stbB</i>	putative fimbrial chaperone	-4,54	0,05	4	N
STM14_0398	-	putative inner membrane protein	-4,14	0,00	3	-
STM14_0399	-	putative periplasmic protein	-10,90	0,02	3	-
STM14_0400.RJ	<i>rtn</i>	Putative rtn protein	-5,01	0,03	5	-
STM14_0401	-	putative response regulator	-3,70	0,02	3	-
STM14_0416	<i>nanT</i>	putative inner membrane protein	-1,97	0,04	3	-
STM14_0417	<i>mod</i>	DNA methylase; type III restriction-modification system	-5,39	0,00	3	L
STM14_0418	<i>res</i>	DNA restriction enzyme; type III restriction-modification system enzyme	-1,17	0,03	7	-
STM14_0419.J	-	hypothetical protein	-4,36	0,04	3	-
STM14_0425	-	putative transcriptional regulator; putative XylS/AraC transcriptional activator	-5,09	0,01	4	K
STM14_0427	<i>yahN</i>	putative transport protein	-8,26	0,04	3	E
STM14_0438	<i>yaiU</i>	flagellar protein	-8,06	0,02	10	M
STM14_0439	<i>yaiV</i>	putative DNA-binding transcriptional regulator	-7,61	0,05	3	-
STM14_0440	<i>ampH</i>	beta-lactamase/D-alanine carboxypeptidase	-8,58	0,05	4	V
STM14_0473	<i>brnQ</i>	branched-chain amino acid transporter	-1,75	0,02	3	E
STM14_0474	<i>proY</i>	putative proline-specific permease	-4,38	0,04	3	E
STM14_0480	<i>tgt</i>	queuine tRNA-ribosyltransferase	-8,02	0,00	4	J
STM14_0517	-	putative periplasmic protein	-1,79	0,05	7	-
STM14_0518	-	TPR repeat-containing protein	-7,38	0,00	7	-
STM14_0535	<i>ppiD</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase D)	-8,92	0,02	15	O
STM14_0540.J	<i>oppA</i>	putative ABC transporter periplasmic binding protein	-2,07	0,01	3	-
STM14_0544	<i>mdlA</i>	putative multidrug transporter membrane\ATP-binding component	-8,39	0,01	3	V
STM14_0563.J	<i>aefA</i>	mechanosensitive channel protein	-9,00	0,04	6	M
STM14_0572	<i>htpG</i>	heat shock protein 90	-1,21	0,04	3	-
STM14_0585	-	putative periplasmic protein	-1,65	0,01	3	-
STM14_0590	<i>potA</i>	putative ABC transporter ATP-binding protein YbbL	-4,69	0,02	4	I
STM14_0598	-	putative outer membrane protein	-1,16	0,01	4	-
STM14_0608	<i>gip</i>	hydroxypyruvate isomerase	-1,81	0,02	3	G
STM14_0609	<i>glxR</i>	tartronic semialdehyde reductase	-5,43	0,00	3	I

STM14_0614	<i>ybbY</i>	putative purine permease YbbY	-1,14	0,02	3	F
STM14_0617	<i>allC</i>	allantoate amidohydrolase	-5,71	0,05	3	E
STM14_0623	<i>purK</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	-4,59	0,02	6	F
STM14_0639	<i>fimH</i>	minor fimbrial subunit	-4,06	0,02	3	N
STM14_0641.J	<i>fimZ</i>	fimbriae z protein	-6,81	0,04	3	T
STM14_0642	<i>fimY</i>	putative regulatory protein	-4,19	0,02	7	-
STM14_0649	-	hypothetical protein	-8,54	0,04	3	-
STM14_0650	-	putative inner membrane protein	-10,64	0,05	3	-
STM14_0664	<i>ybdG</i>	hypothetical protein	-7,66	0,04	5	M
STM14_0667	-	putative inner membrane protein	-1,38	0,04	3	-
STM14_0669.R	-	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	-4,53	0,03	3	-
STM14_0687	<i>fepE</i>	ferric enterobactin transport protein FepE	-1,03	0,04	4	M
STM14_0694	<i>entE</i>	enterobactin synthase subunit E	-7,28	0,04	3	Q
STM14_0705	<i>ybdO</i>	putative transcriptional regulator	-5,48	0,04	5	K
STM14_0725	<i>citC</i>	citrate lyase synthetase	-8,13	0,01	5	C
STM14_0727	<i>dpiB</i>	sensory histidine kinase	-7,56	0,02	4	T
STM14_0729	<i>dcuC</i>	C4-dicarboxylate transporter DcuC	-1,40	0,03	5	C
STM14_0739	<i>ybeF</i>	putative DNA-binding transcriptional regulator	-4,66	0,05	4	K
STM14_0759	<i>kdgT</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease	-1,27	0,00	4	G
STM14_0760	<i>fleQ</i>	putative sigma-54 dependent transcriptional regulator	-4,52	0,02	6	K
STM14_0764	<i>ybeS</i>	putative molecular chaperone	-7,99	0,05	3	-
STM14_0767	<i>hscC</i>	putative heatshock protein	-6,05	0,01	4	O
STM14_0771	<i>gltK</i>	glutamate/aspartate transporter	-1,35	0,00	3	E
STM14_0781	<i>miaB</i>	rRNA modification protein	-6,15	0,04	7	J
STM14_0802	<i>ybfM</i>	putative outer membrane protein	-8,36	0,00	3	-
STM14_0805	<i>citB</i>	citrate utilization protein b	-4,68	0,04	5	-
STM14_0894	<i>hemU-1</i>	putative ABC transport protein	-10,14	0,04	3	-
STM14_0904	<i>modF</i>	putative molybdenum transport ATP-binding protein ModF	-8,12	0,01	3	P
STM14_0919.J	<i>bioA</i>	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	-2,08	0,03	3	H
STM14_0928	<i>slrP</i>	leucine-rich repeat-containing protein; secreted by SPI-1	-7,70	0,02	8	-
STM14_0960	<i>kefA</i>	hypothetical protein	-4,77	0,03	4	-
STM14_0972	<i>ybiP</i>	putative integral membrane protein	-8,53	0,04	4	-
STM14_0978	<i>ybiT</i>	putative ABC transporter ATPase component	-8,86	0,02	3	-
STM14_0980	<i>ybiV</i>	putative hydrolase; would extend upstream except for stop codon	-8,19	0,03	3	-
STM14_1003	<i>etfA</i>	putative electron transfer protein alpha subunit	-7,60	0,01	5	C
STM14_1005	<i>acd-6</i>	putative acyl-CoA dehydrogenase	-11,53	0,00	3	I
STM14_1007	-	putative dehydrogenase	-7,52	0,02	5	C
STM14_1009	-	putative inner membrane protein	-1,78	0,04	5	-
STM14_1035	<i>ulaA-1</i>	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	-5,56	0,01	4	S
STM14_1052	<i>hcp</i>	hydroxylamine reductase	-5,97	0,01	4	C

STM14_1056	<i>ybjD</i>	hypothetical protein	-7,60	0,00	3	L
STM14_1066	<i>tnpA_3</i>	transposase	-7,00	0,02	4	L
STM14_1077	<i>aat</i>	leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	-1,07	0,02	3	O
STM14_1083	<i>lrp</i>	leucine-responsive transcriptional regulator	-1,72	0,05	3	K
STM14_1095	<i>xasA</i>	putative amino-acid transporter	-10,59	0,04	5	E
STM14_1099	<i>pflB</i>	pyruvate formate lyase I	-8,43	0,01	3	C
STM14_1100.L	<i>focA</i>	formate transporter	-1,55	0,03	3	P
STM14_1105	<i>serC</i>	phosphoserine aminotransferase	-5,29	0,04	6	H
STM14_1106	<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-8,43	0,02	3	E
STM14_1112	<i>ycaI</i>	hypothetical protein	-7,83	0,04	3	R
STM14_1138	-	putative transcriptional regulator	-8,09	0,02	4	-
STM14_1144	-	exodeoxyribonuclease	-4,85	0,04	3	L
STM14_1166	<i>gtgA</i>	bacteriophage virulence determinant	-7,16	0,02	4	-
STM14_1171	-	hypothetical protein	-6,22	0,05	4	-
STM14_1199	<i>pepN</i>	aminopeptidase N	-5,52	0,05	3	E
STM14_1208	<i>ymbA</i>	putative outer membrane protein	-1,81	0,01	3	S
STM14_1232	<i>pipA</i>	pathogenicity island-encoded protein A	-4,54	0,05	3	-
STM14_1240	<i>pipD</i>	pathogenicity island-encoded protein D	-4,23	0,01	4	E
STM14_1287	-	putative sodium/glucose cotransporter	-1,29	0,05	5	-
STM14_1295	<i>nanT</i>	putative sialic acid transporter	-8,53	0,00	3	-
STM14_1317.R	<i>mdoG</i>	Glucans biosynthesis protein G precursor	-4,85	0,00	4	P
STM14_1318.J	<i>mdoH</i>	periplasmic glucans biosynthesis protein MdoH	-8,57	0,01	7	M
STM14_1406	<i>tnpA_4</i>	transposase	-4,50	0,04	3	R
STM14_1470	-	phage tail component H-like protein	-2,03	0,04	3	X
STM14_1474.L	-	tail assembly protein I-like	-3,17	0,04	3	X
STM14_1475	-	host specificity protein	-8,85	0,00	4	-
STM14_1479	-	phage tail assembly-like protein	-5,60	0,01	5	X
STM14_1614	-	putative DNA/RNA non-specific endonuclease	-7,48	0,02	4	-
STM14_1700	<i>sseF</i>	secreted effector protein	-10,82	0,01	3	-
STM14_1739	-	putative inner membrane protein	-4,80	0,03	3	-
STM14_2178	<i>dadX</i>	alanine racemase	-3,97	0,03	3	M
STM14_2206	<i>pabB</i>	para-aminobenzoate synthase component I	-5,55	0,03	3	E
STM14_2231	<i>htpX</i>	heat shock protein HtpX	-1,40	0,02	3	O
STM14_2236	<i>pqiB</i>	putative inner membrane protein	-1,07	0,04	3	-
STM14_2308.J	<i>yebB</i>	putative periplasmic protein	-5,65	0,04	4	-
STM14_2387.J	-	putative 50S ribosomal protein	-1,71	0,01	3	J
STM14_2431	-	hypothetical protein	-7,91	0,03	3	-
STM14_2477	-	hypothetical protein	-8,04	0,00	3	-
STM14_2484	-	integrase protein	-7,42	0,05	3	-
STM14_2491	-	TPR repeat-containing protein	-1,32	0,00	5	-
STM14_2506	<i>cobU</i>	adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase	-1,86	0,04	3	H

STM14_2525	<i>pocR</i>	transcriptional regulator	-8,17	0,01	5	K
STM14_2526	<i>pduF</i>	propanediol diffusion facilitator	-4,41	0,04	3	G
STM14_2555	<i>phsA</i>	thiosulfate reductase precursor	-5,97	0,03	6	C
STM14_2575	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	-5,33	0,05	5	G
STM14_2576	<i>wbaP</i>	undecaprenol-phosphate galactosephosphotransferase/O-antigen transferase	-4,88	0,04	7	M
STM14_2577	<i>wbaK</i>	phosphomannomutase	-5,20	0,03	16	G
STM14_2578	<i>wbaM</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	-1,57	0,02	5	M
STM14_2579	<i>wbaN</i>	rhamnosyl transferase	-5,22	0,01	6	M
STM14_2588	<i>wbaC</i>	dTDP-4,deoxyrhamnose 3,5 epimerase	-4,91	0,04	4	M
STM14_2590	<i>wbaD</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	-3,27	0,01	3	M
STM14_2591	<i>wbaB</i>	dTDP-glucose 4,6 dehydratase	-1,48	0,03	5	M
STM14_2595	<i>wcaK</i>	putative pyruvyl transferase	-8,29	0,00	3	S
STM14_2607	<i>wcaD</i>	putative colanic acid biosynthesis protein	-5,18	0,00	3	-
STM14_2611	<i>wzc</i>	tyrosine kinase	-8,27	0,04	3	M
STM14_2620.RJ	<i>yegE</i>	Putative membrane protein	-4,57	0,04	5	T
STM14_2630.RJ	-	Putative cytoplasmic protein	-7,43	0,01	3	-
STM14_2643.R	<i>yegT</i>	Putative nucleoside transporter yegT	-4,24	0,01	3	G
STM14_2653	<i>stcC</i>	putative outer membrane protein	-4,92	0,03	9	N
STM14_2656	<i>yehE</i>	putative outer membrane protein	-4,95	0,02	3	-
STM14_2693	<i>gltD</i>	putative oxidoreductase	-1,47	0,03	3	E
STM14_2694	<i>yeiA</i>	dihydropyrimidine dehydrogenase	-1,54	0,02	3	F
STM14_2696	<i>mglA</i>	galactose/methyl galactoside transporter ATP-binding protein	-5,15	0,00	3	G
STM14_2741	<i>oppB_2</i>	putative ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system permease	-1,66	0,01	3	-
STM14_2743	<i>yefF</i>	putative ABC-type transport system ATPase component	-5,81	0,01	6	R
STM14_2758	<i>oafA</i>	O-antigen acetylase	-1,85	0,05	16	I
STM14_2759	-	putative cytoplasmic protein	-4,90	0,02	3	-
STM14_2761	-	hypothetical protein	-2,50	0,02	4	-
STM14_2765	-	hypothetical protein	-1,50	0,02	3	-
STM14_2771	-	putative tail fiber protein of phage	-10,19	0,05	3	X
STM14_2776	<i>ccmH_1</i>	putative heme lyase subunit	-7,84	0,00	3	O
STM14_2778	<i>ccmF_1</i>	cytochrome c-type biogenesis protein	-5,43	0,02	3	O
STM14_2800	<i>rscD</i>	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory system with RcsBC	-1,06	0,02	3	T
STM14_2802	<i>rscC</i>	hybrid sensory kinase in two-component regulatory system with RcsB and YojN	-1,51	0,03	5	T
STM14_2807	-	putative dehydratase	-1,04	0,03	3	-
STM14_2808	-	putative permease	-5,89	0,04	3	-
STM14_2809	-	putative regulatory protein	-2,25	0,00	3	-
STM14_2815	-	putative permease	-4,86	0,01	4	-
STM14_2817	<i>glpQ</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase	-8,53	0,02	3	C
STM14_2820	<i>glpB</i>	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B	-2,26	0,02	4	E
STM14_2828	<i>yfaW</i>	putative galactonate dehydratase	-4,01	0,03	4	M

STM14_2831.R	<i>yfaZ</i>	Uncharacterized protein YfaZ precursor	-4,89	0,03	3	-
STM14_2832	<i>yfaO</i>	putative NTP pyrophosphohydrolase	-7,78	0,00	3	L
STM14_2839	<i>arnT</i>	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase	-4,89	0,01	6	M
STM14_2873	<i>lrhA</i>	NADH dehydrogenase transcriptional repressor	-10,59	0,02	5	K
STM14_2874	<i>yfbQ</i>	aminotransferase AlaT	-10,55	0,04	5	E
STM14_2879	-	hypothetical protein	-4,71	0,03	3	-
STM14_2884	<i>yfcC</i>	hypothetical protein	-1,61	0,00	3	S
STM14_2887	<i>ulaA_2</i>	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	-8,11	0,01	5	S
STM14_2905	-	putative cytoplasmic protein	-4,75	0,00	8	-
STM14_2906	-	putative amino acid transporter	-8,70	0,05	7	E
STM14_2910	<i>cvpA</i>	colicin V production protein	-9,00	0,05	8	R
STM14_2924	-	putative cytoplasmic protein	-2,03	0,04	3	-
STM14_2934	<i>yfcB</i>	N5-glutamine S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	-1,07	0,04	3	J
STM14_2937	<i>fadJ</i>	multifunctional fatty acid oxidation complex subunit alpha	-4,79	0,02	4	I
STM14_2946	<i>pgtE</i>	outer membrane protease; outer membrane protease	-5,41	0,03	5	M
STM14_2949.RJ	<i>pgtC</i>	Phosphoglycerate transport regulatory protein PgtC	-1,21	0,03	3	P
STM14_2976	<i>xapB</i>	xanthosine permease	-1,40	0,03	5	G
STM14_2978	<i>yfeN</i>	hypothetical protein	-1,00	0,04	3	-
STM14_3010	-	putative inner membrane protein	-8,11	0,01	4	-
STM14_3020	<i>eutJ</i>	ethanolamine utilization protein	-2,10	0,03	3	E
STM14_3028	<i>eutS</i>	putative carboxysome structural protein	-4,92	0,01	3	E
STM14_3049	<i>ypfJ</i>	putative inner membrane protein	-1,79	0,04	3	-
STM14_3050	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-6,23	0,03	3	F
STM14_3057	<i>perM</i>	putative permease	-7,80	0,03	3	R
STM14_3058.J	<i>yfgC</i>	putative inner membrane or exported	-4,32	0,01	3	-
STM14_3061	<i>uraA</i>	uracil transporter	-5,58	0,05	3	F
STM14_3064	<i>purM</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	-9,45	0,01	3	-
STM14_3065	<i>purN</i>	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	-6,01	0,04	6	F
STM14_3066	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	-2,73	0,01	5	P
STM14_3068	<i>yfgF</i>	putative diguanylate cyclase	-6,95	0,03	5	-
STM14_3078.LJ	<i>shdA</i>	AIDA autotransporter-like protein	-5,45	0,02	5	M
STM14_3082.J	<i>ratB</i>	putative outer membrane protein	-8,12	0,02	3	-
STM14_3083	<i>ratA</i>	putative outer membrane protein	-7,92	0,03	3	-
STM14_3105	-	putative inner membrane lipoprotein	-5,22	0,01	7	-
STM14_3108	-	putative cytoplasmic protein	-1,33	0,03	5	-
STM14_3126	<i>asrA</i>	anaerobic sulfide reductase	-6,95	0,04	3	C
STM14_3136	<i>cadC</i>	DNA-binding transcriptional activator CadC	-4,88	0,00	3	K
STM14_3151	<i>murQ</i>	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	-5,29	0,04	4	R
STM14_3153	<i>panE</i>	2-dehydropantoate 2-reductase	-8,30	0,02	8	Q
STM14_3154	-	putative permease	-2,66	0,05	4	-
STM14_3155	<i>cynR</i>	putative transcriptional regulator	-1,24	0,03	3	K

STM14_3166	-	transposase-like protein	-1,11	0,04	3	-
STM14_3168	<i>mig-3</i> [J]_2	phage tail assembly-like protein	-1,14	0,03	5	-
STM14_3169	<i>mig-3</i> [J]_3	phage tail assembly-like protein	-1,06	0,00	5	-
STM14_3170	-	tail fiber-like protein	-5,32	0,03	3	-
STM14_3218	<i>parAj</i>	chromosome partitioning ATPase	-5,83	0,01	5	D
STM14_3220	-	hypothetical protein	-8,09	0,04	3	-
STM14_3240	<i>srmB</i>	ATP-dependent RNA helicase SrmB	-8,26	0,02	3	L
STM14_3252	<i>kgtP</i>	alpha-ketoglutarate transporter	-2,27	0,02	4	G
STM14_3256.J	<i>rrlG</i>	Large Subunit Ribosomal RNA	-5,99	0,02	10	J
STM14_3261	<i>clpB_2</i>	protein disaggregation chaperone	-1,33	0,05	14	O
STM14_3268	<i>pheA</i>	bifunctional chorismate mutase/prephenate dehydratase	-1,09	0,04	3	E
STM14_3275	<i>yfiN</i>	hypothetical protein	-9,75	0,01	5	T
STM14_3294.J	<i>smpB</i>	SsrA-binding protein	-8,74	0,01	4	O
STM14_3297	-	pseudogene	-7,48	0,03	14	-
STM14_3305	-	putative cytoplasmic protein	-7,36	0,02	4	-
STM14_3334	-	putative DNA/RNA helicase	-9,41	0,03	6	-
STM14_3336	-	putative transposase	-4,95	0,01	4	-
STM14_3345	<i>iroC</i>	putative ABC transporter protein	-1,16	0,05	5	V
STM14_3348	<i>iroN</i>	outer membrane receptor of ferric enterobactin and colicins B and D	-1,98	0,01	6	P
STM14_3351	-	hypothetical protein	-4,01	0,01	3	-
STM14_3358	<i>nixA</i>	putative nickel transporter	-10,26	0,01	4	P
STM14_3369	<i>gabP</i>	gamma-aminobutyrate transporter	-8,38	0,03	4	E
STM14_3391	<i>proV</i>	glycine betaine transporter ATP-binding subunit	-7,34	0,04	11	E
STM14_3392	<i>proW</i>	glycine betaine transporter membrane protein	-2,00	0,03	3	E
STM14_3401	-	putative glycoporin	-8,67	0,02	7	-
STM14_3434	<i>hypF</i>	hydrogenase maturation protein	-7,87	0,02	4	O
STM14_3463	<i>sprB</i>	transcriptional regulator	-4,97	0,04	5	K
STM14_3469	<i>orgA</i>	needle complex assembly protein	-4,79	0,00	4	-
STM14_3470	<i>prgK</i>	needle complex inner membrane lipoprotein	-8,43	0,02	7	U
STM14_3471	<i>prgJ</i>	needle complex minor subunit	-7,44	0,02	5	-
STM14_3473.J	<i>prgH</i>	prgH protein	-7,30	0,04	8	-
STM14_3474	<i>hilD</i>	invasion protein regulatory protein	-11,11	0,01	8	K
STM14_3475	<i>hilA</i>	invasion protein regulator	-6,77	0,04	14	K
STM14_3476	<i>iagB</i>	invasion protein precursor	-5,03	0,00	3	M
STM14_3477	<i>sptP</i>	protein tyrosine phosphatase/GTPase activating protein	-4,13	0,03	9	-
STM14_3481	<i>sipA</i>	secreted effector protein	-5,60	0,02	14	-
STM14_3483	<i>sipC</i>	translocation machinery component	-2,13	0,04	11	-
STM14_3484	<i>sipB</i>	translocation machinery component	-1,71	0,01	3	-
STM14_3485	<i>sicA</i>	secretion chaperone	-1,63	0,04	5	R
STM14_3487	<i>spaR</i>	needle complex export protein	-8,21	0,00	5	U
STM14_3489	<i>spaP</i>	surface presentation of antigens protein SpaP	-7,83	0,03	4	U

STM14_3490	<i>spaO</i>	surface presentation of antigens protein SpaO	-5,23	0,04	5	N
STM14_3492	<i>invI</i>	needle complex assembly protein	-7,71	0,04	3	-
STM14_3494	<i>invB</i>	secretion chaperone	-4,81	0,01	3	-
STM14_3495	<i>invA</i>	needle complex export protein	-9,41	0,01	26	U
STM14_3496	<i>invE</i>	invasion protein	-1,68	0,00	7	-
STM14_3497	<i>invG</i>	outer membrane secretin precursor	-8,10	0,04	14	N
STM14_3498.J	<i>invF</i>	invasion protein invf	-4,62	0,03	6	K
STM14_3499	<i>invH</i>	needle complex outer membrane lipoprotein precursor	-7,31	0,00	3	-
STM14_3500	-	putative cytoplasmic protein	-4,53	0,04	4	-
STM14_3509	<i>pphB</i>	serine/threonine-specific protein phosphatase 2	-4,44	0,04	3	T
STM14_3514.RJ	-	Possible LysR-family transcriptional regulator	-1,33	0,02	3	-
STM14_3524	<i>vdcC</i>	putative 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase	-8,48	0,01	3	H
STM14_3539	<i>cysD</i>	sulfate adenyltransferase subunit 2	-4,72	0,01	3	E
STM14_3548	<i>ygcB</i>	putative helicase	-7,09	0,00	3	R
STM14_3551	<i>cysH</i>	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-7,41	0,00	3	E
STM14_3553	<i>cysJ</i>	sulfite reductase subunit alpha	-4,57	0,02	3	P
STM14_3559	<i>mazG</i>	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	-1,27	0,00	3	R
STM14_3562	<i>parE</i>	hypothetical protein	-1,05	0,05	3	-
STM14_3564	<i>relA</i>	GDP/GTP pyrophosphokinase; (p)ppGpp synthetase	-4,66	0,01	7	T
STM14_3566	<i>barA</i>	hybrid sensory histidine kinase BarA	-4,24	0,03	5	T
STM14_3568	<i>gudD</i>	d-glucarate dehydratase	-5,04	0,02	4	M
STM14_3570	<i>gudT</i>	putative D-glucarate permease	-1,91	0,03	3	G
STM14_3581	<i>sdaC_1</i>	putative serine transport protein	-5,95	0,04	3	E
STM14_3582	<i>sdaB</i>	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase 2	-1,76	0,04	4	E
STM14_3589	<i>fucP</i>	pseudogene; frameshift; fucose permease	-8,09	0,01	3	#N/A
STM14_3593	<i>fucR</i>	DNA-binding transcriptional activator FucR	-2,82	0,04	3	K
STM14_3606	<i>amiC</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-1,68	0,01	3	M
STM14_3610	<i>ptr</i>	protease III	-1,55	0,01	4	O
STM14_3614	<i>ppdB</i>	hypothetical protein; putative component involved in type IV pilin biogenesis	-1,10	0,01	3	U
STM14_3632	<i>tas</i>	putative aldo-keto reductase	-1,16	0,01	4	C
STM14_3648.RJ	-	hypothetical protein	-4,35	0,05	5	-
STM14_3650	<i>sdaC_2</i>	putative transport protein	-4,96	0,02	12	E
STM14_3656	<i>stdC</i>	putative fimbrial chaperone	-11,23	0,04	4	N
STM14_3659	<i>stdA</i>	putative fimbrial-like protein	-2,48	0,05	4	-
STM14_3660	-	hypothetical protein	-1,82	0,04	4	-
STM14_3661	<i>rcK</i>	Ail/OmpX-like protein	-5,30	0,02	4	-
STM14_3674	<i>recJ</i>	ssDNA exonuclease RecJ	-4,96	0,02	6	L
STM14_3685	-	putative outer membrane protein	-1,85	0,03	7	-
STM14_3687.J	<i>gcvP</i>	glycine dehydrogenase	-4,53	0,01	5	E
STM14_3699	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-7,83	0,00	3	E
STM14_3707	<i>yggB</i>	mechanosensitive channel MscS	-8,05	0,04	5	M

STM14_3720	<i>speB</i>	agmatinase	-3,25	0,03	3	E
STM14_3724	-	putative malate/L-lactate dehydrogenase	-7,21	0,02	4	-
STM14_3745	<i>yggT</i>	putative integral membrane protein	-7,77	0,04	4	S
STM14_3766	-	putative lactoylglutathione lyase	-7,76	0,01	4	-
STM14_3767	<i>abfT-1</i>	putative acetyl-CoA hydrolase	-4,42	0,03	6	I
STM14_3771	-	putative arylsulfatase	-11,15	0,04	3	I
STM14_3775.R	-	Putative response regulator	-1,38	0,01	5	-
STM14_3776	-	putative cytoplasmic protein	-1,43	0,02	8	-
STM14_3777	-	putative amino acid transporter	-5,08	0,02	3	-
STM14_3787	-	putative xylanase/chitin deacetylase	-4,77	0,04	5	-
STM14_3788	-	putative amidohydrolase	-11,26	0,03	5	-
STM14_3791	<i>exuT</i>	putative permease	-6,97	0,05	3	R
STM14_3795.J	<i>uxuA</i>	mannonate dehydratase	-1,58	0,02	3	G
STM14_3797	<i>uxaC</i>	glucuronate isomerase	-8,45	0,00	3	G
STM14_3799	-	putative methyl-accepting chemotaxis protein	-4,50	0,04	4	-
STM14_3806	-	putative periplasmic ferrichrome-binding protein	-2,19	0,02	4	P
STM14_3811	<i>hybC</i>	hydrogenase 2 large subunit	-5,05	0,02	4	C
STM14_3820	-	putative ATP-dependent RNA helicase-like protein	-3,87	0,05	3	-
STM14_3827	<i>metC</i>	cystathionine beta-lyase	-2,21	0,01	11	E
STM14_3828	<i>yghB</i>	hypothetical protein	-1,85	0,00	4	S
STM14_3831	<i>yqhD</i>	putative alcohol dehydrogenase	-1,27	0,00	3	C
STM14_3835.R	-	2-oxoglutarate/malate translocator	-8,19	0,03	3	-
STM14_3839	<i>ygiR</i>	hypothetical protein; putative FeS oxidoreductase family 2	-1,30	0,02	5	C
STM14_3842	-	putative inner membrane protein	-4,66	0,03	6	-
STM14_3843	<i>ygiK</i>	putative transporter	-7,49	0,04	7	G
STM14_3852	<i>mdaB</i>	NADPH-specific quinone oxidoreductase	-5,16	0,02	3	R
STM14_3856	<i>icc</i>	cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase	-7,40	0,02	3	R
STM14_3862	<i>ygiC</i>	putative glutathionylspermidine synthase	-1,65	0,03	3	E
STM14_3866	-	putative arylsulfate sulfotransferase	-4,85	0,04	10	-
STM14_3867	<i>dsbA_1</i>	putative disulfide bond formation protein	-1,33	0,03	3	O
STM14_3877	<i>glnE</i>	bifunctional glutamine-synthetase adenylyltransferase/deadenylyltransferase	-8,18	0,04	9	O
STM14_3893	<i>tsr</i> <i>[J]_3</i>	putative methyl-accepting chemotaxis protein	-4,80	0,05	3	-
STM14_3898	<i>fadH</i>	2,4-dieonyl-CoA reductase	-1,22	0,03	3	R
STM14_3923	<i>tdcE</i>	pyruvate formate-lyase 4/2-ketobutyrate formate-lyase	-4,52	0,00	4	C
STM14_3924	<i>tdcD</i>	propionate/acetate kinase	-1,17	0,01	6	C
STM14_3925	<i>tdcC</i>	threonine/serine transporter TdcC	-7,67	0,04	3	E
STM14_3926	<i>tdcB</i>	threonine dehydratase	-4,85	0,02	7	E
STM14_3927	<i>tdcA</i>	DNA-binding transcriptional activator TdcA	-8,62	0,02	5	K
STM14_3945	<i>yraL</i>	putative methyltransferase	-1,31	0,05	7	R
STM14_3946	<i>yraM</i>	putative transglycosylase	-7,97	0,03	10	R
STM14_3959	-	putative inner membrane protein	-4,51	0,03	4	-

STM14_3974	-	putative cytoplasmic protein	-1,63	0,03	3	-
STM14_3989	<i>yhbE</i>	pseudogene	-4,34	0,05	3	#N/A
STM14_4020	<i>gltB</i>	glutamate synthase subunit alpha	-3,61	0,03	12	E
STM14_4024	<i>codB</i>	cytosine permease	-1,08	0,03	3	F
STM14_4029	<i>nanT</i>	putative sialic acid transporter	-1,73	0,03	3	G
STM14_4042	-	putative inner membrane protein	-1,41	0,04	3	-
STM14_4045	<i>oadG</i>	oxaloacetate decarboxylase subunit gamma	-1,35	0,01	3	C
STM14_4046	<i>fum-1</i>	L(+)-tartrate dehydratase subunit beta	-4,92	0,01	7	G
STM14_4049	-	putative regulatory protein	-5,58	0,03	3	-
STM14_4052.J	-	hypothetical protein	-4,54	0,02	4	-
STM14_4058	<i>yhcP</i>	p-hydroxybenzoic acid efflux subunit AaeB	-5,89	0,02	3	S
STM14_4062	<i>tldD</i>	protease TldD	-1,07	0,04	4	R
STM14_4063	<i>yhdP</i>	hypothetical protein	-1,72	0,05	9	S
STM14_4064	<i>cafA</i>	ribonuclease G	-9,41	0,03	3	J
STM14_4072	<i>yedY</i>	putative sulfite oxidase subunit YedY	-2,02	0,04	3	-
STM14_4080	<i>prmA</i>	ribosomal protein L11 methyltransferase	-3,82	0,03	3	J
STM14_4086	<i>ylaB</i>	putative signal transduction protein	-8,47	0,01	3	T
STM14_4091	<i>acrF</i>	multidrug transport protein	-5,28	0,01	9	V
STM14_4099.J	<i>rrlD</i>	Large Subunit Ribosomal RNA	-1,23	0,04	7	J
STM14_4108	<i>smf</i>	hypothetical protein	-1,00	0,04	8	L
STM14_4111	<i>sun</i>	16S rRNA methyltransferase B	-4,36	0,04	4	J
STM14_4158	<i>slyX</i>	hypothetical protein	-1,88	0,00	3	S
STM14_4159	<i>slyD</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-1,52	0,03	6	O
STM14_4161	<i>kefB</i>	glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB	-5,40	0,03	6	P
STM14_4164	<i>yheS</i>	putative ABC transporter ATP-binding protein	-8,05	0,01	4	R
STM14_4168.J	<i>yheT</i>	putative hydrolase	-5,45	0,01	4	R
STM14_4171	<i>yhfA</i>	hypothetical protein	-5,03	0,01	3	O
STM14_4174	<i>yhfK</i>	putative inner membrane protein	-4,64	0,05	9	S
STM14_4175	<i>argD_2</i>	bifunctional N-succinyldiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein	-1,35	0,04	7	E
STM14_4176	<i>pabA</i>	para-aminobenzoate synthase component II	-11,40	0,04	7	E
STM14_4178.J	<i>yhfG</i>	putative cytoplasmic protein	-1,32	0,04	3	-
STM14_4179	<i>ppiA</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)	-1,39	0,04	5	O
STM14_4181	<i>tsgA</i>	hypothetical protein	-1,53	0,03	4	-
STM14_4183	<i>nirB</i>	nitrite reductase large subunit	-8,04	0,05	6	C
STM14_4186	<i>nirC</i>	nitrite transporter NirC	-7,91	0,00	3	P
STM14_4187	<i>cysG</i>	siroheme synthase	-1,14	0,01	7	H
STM14_4188	<i>bigA</i>	putative surface-exposed virulence protein	-1,28	0,02	18	-
STM14_4205	<i>mrcA</i>	peptidoglycan synthetase	-5,08	0,04	7	M
STM14_4212	<i>yhgE</i>	putative inner membrane protein	-2,08	0,04	3	-
STM14_4215	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-4,07	0,04	4	C
STM14_4219.RJ	<i>yhgF</i>	Transcription accessory protein (S1 RNA-binding domain)	-8,56	0,02	3	K

STM14_4220.P	<i>STnc7 60</i>	-	-5,50	0,03	3	-
STM14_4221	<i>feoA</i>	ferrous iron transport protein A	-1,43	0,03	5	P
STM14_4222	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B	-1,37	0,04	23	P
STM14_4225	<i>yfaD</i>	putative cytoplasmic protein	-1,61	0,04	5	-
STM14_4226	<i>bioH</i>	carboxylesterase BioH	-2,02	0,02	10	R
STM14_4231	<i>malQ</i>	4-alpha-glucanotransferase	-1,99	0,03	4	G
STM14_4232	<i>malP</i>	maltodextrin phosphorylase	-5,39	0,02	6	G
STM14_4234	<i>malT</i>	transcriptional regulator MalT	-5,26	0,03	10	K
STM14_4244	<i>glpG</i>	intramembrane serine protease GlpG	-1,14	0,01	5	R
STM14_4249	<i>gldA_1</i>	glycerol dehydrogenase; forms dimers and octamers	-1,01	0,03	4	C
STM14_4250	-	pseudogene; frameshift; putative permease	-1,71	0,03	3	-
STM14_4251	<i>ilvD</i>	putative dihydroxyacid dehydratase	-2,90	0,05	4	E
STM14_4252	-	putative dihydrodipicolinate synthetase	-7,85	0,01	17	-
STM14_4253	-	putative transcriptional regulator	-4,63	0,03	3	-
STM14_4254	<i>glgP</i>	glycogen phosphorylase	-6,53	0,03	3	G
STM14_4264	<i>gntU</i>	low affinity gluconate transporter	-5,02	0,01	5	G
STM14_4272	<i>rbsK</i>	putative transcriptional regulator	-8,20	0,04	7	K
STM14_4273	-	putative cytoplasmic protein	-11,19	0,00	14	-
STM14_4274	-	putative inner membrane protein	-7,87	0,01	5	-
STM14_4275	-	putative phosphotriesterase	-1,00	0,02	3	-
STM14_4286	<i>livF</i>	leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit	-1,77	0,04	4	E
STM14_4289	<i>livH</i>	branched-chain amino acid transporter permease subunit LivH	-7,92	0,05	3	E
STM14_4300	<i>rsmD</i>	16S rRNA m(2)G966-methyltransferase	-1,24	0,01	4	J
STM14_4304	<i>zntA</i>	zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase	-5,46	0,04	4	P
STM14_4305	<i>tcp</i>	methyl-accepting transmembrane citrate/phenol chemoreceptor	-4,78	0,04	5	N
STM14_4309.J	<i>yhhS</i>	drug transporter, putative	-8,51	0,01	6	-
STM14_4310	<i>yhhT</i>	putative permease	-6,21	0,00	4	R
STM14_4321	<i>dtpB</i>	inner membrane transporter YhiP	-2,30	0,02	5	-
STM14_4323	<i>prlC</i>	oligopeptidase A	-8,86	0,02	9	E
STM14_4324	-	putative phosphatase	-4,86	0,01	3	-
STM14_4326	<i>yhiR</i>	putative cytoplasmic protein	-5,63	0,04	3	R
STM14_4328	-	putative L-asparaginase	-1,00	0,02	8	E
STM14_4329	<i>dcuB</i>	anaerobic C4-dicarboxylate transporter;	-4,34	0,04	16	G
STM14_4330	-	putative sugar kinase	-1,33	0,04	5	-
STM14_4331	-	putative phosphosugar isomerase	-4,81	0,01	3	-
STM14_4334	<i>treF</i>	trehalase; catalyzes the hydrolysis of trehalose to glucose	-5,41	0,01	4	G
STM14_4337	-	putative phage endolysin	-7,85	0,04	3	-
STM14_4338	<i>yhjB</i>	putative transcriptional regulator	-7,39	0,01	8	T
STM14_4341.RJ	<i>yhjC</i>	LysR family transcriptional regulator YhjC	-4,96	0,04	6	K
STM14_4344	<i>yhjE</i>	putative transport protein	-10,93	0,01	3	G
STM14_4351	<i>dctA</i>	C4-dicarboxylate transporter DctA	-2,70	0,00	5	C

STM14_4355	<i>yhjL</i>	cellulose synthase subunit BcsC	-4,94	0,02	9	R
STM14_4356	<i>bcsC</i>	endo-1,4-D-glucanase	-4,45	0,01	3	G
STM14_4358	<i>bcsA</i>	cellulose synthase catalytic subunit	-4,87	0,03	6	M
STM14_4361	-	hypothetical protein	-5,09	0,04	4	-
STM14_4362	<i>yhjS</i>	putative cytoplasmic protein	-5,51	0,01	8	-
STM14_4364	<i>yhjU</i>	putative inner membrane protein	-1,40	0,01	3	-
STM14_4369	<i>yhjV</i>	putative transport protein	-4,83	0,02	24	E
STM14_4372	<i>dppC_2</i>	dipeptide transporter	-1,64	0,03	6	-
STM14_4377	-	hypothetical protein	-8,37	0,02	3	-
STM14_4382	<i>yhjW</i>	phosphoethanolamine transferase	-4,96	0,04	4	R
STM14_4384	<i>lpfD</i>	LpfD protein precursor	-1,25	0,05	12	N
STM14_4385	<i>lpfC</i>	long polar fimbrial outer membrane usher protein	-4,48	0,02	7	N
STM14_4386	<i>lpfB</i>	long polar fimbrial chaperone precursor	-8,36	0,04	10	N
STM14_4389	<i>apeE</i>	putative lipase	-8,59	0,01	3	-
STM14_4392	<i>bisC</i>	biotin sulfoxide reductase	-1,60	0,03	5	C
STM14_4400	-	hypothetical protein	-9,99	0,01	3	-
STM14_4404	-	putative acetyltransferase	-1,74	0,03	8	-
STM14_4405	-	pseudogene	-7,82	0,01	7	-
STM14_4411	<i>yiaH</i>	putative inner membrane protein	-10,41	0,05	16	S
STM14_4412	<i>yiaB</i>	putative inner membrane protein	-7,97	0,03	7	S
STM14_4413	<i>xylB</i>	xylulokinase	-7,93	0,05	4	G
STM14_4414	<i>xylA</i>	xylose isomerase; catalyzes the interconversion of D-xylose to D-xylulose	-7,61	0,04	3	G
STM14_4421	<i>avtA</i>	valine--pyruvate transaminase	-5,57	0,00	3	E
STM14_4427	-	putative chemotaxis protein; similar to CheA	-1,15	0,02	7	-
STM14_4428	<i>yiaM</i>	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transporter small permease protein YiaM	-2,86	0,01	6	G
STM14_4429	<i>yiaN</i>	hypothetical protein	-1,94	0,04	5	G
STM14_4436	-	putative cytoplasmic protein	-4,77	0,03	4	-
STM14_4438	<i>aldB</i>	aldehyde dehydrogenase B	-6,80	0,05	4	C
STM14_4439	-	putative transcriptional regulator	-11,58	0,04	3	-
STM14_4440	<i>selB</i>	selenocysteinyl-tRNA-specific translation factor	-4,63	0,01	3	J
STM14_4443	<i>mtlA</i>	mannitol-specific enzyme IIABC component	-5,41	0,05	10	G
STM14_4450	-	putative inner membrane protein	-4,44	0,04	13	-
STM14_4451	<i>lldP</i>	L-lactate permease	-4,61	0,04	3	C
STM14_4453	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase	-4,77	0,01	3	C
STM14_4457	-	putative mandelate racemase	-10,37	0,03	4	-
STM14_4458	-	putative permease	-7,89	0,03	14	-
STM14_4464	<i>pmgI</i>	phosphoglyceromutase	-4,35	0,00	3	G
STM14_4465	<i>yibP</i>	hypothetical protein	-8,12	0,01	3	D
STM14_4467	<i>yibD</i>	glycosyl transferase	-11,34	0,02	9	M
STM14_4474	<i>waaL</i>	O-antigen ligase	-1,41	0,04	26	M
STM14_4476	<i>waaZ</i>	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	-5,04	0,03	12	-

STM14_4477	<i>waaY</i>	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	-8,63	0,04	12	-
STM14_4478	<i>waaJ</i>	lipopolysaccharide glucosyltransferase	-7,28	0,01	6	M
STM14_4479.J	<i>waal</i>	lipopolysaccharide 1,3-galactosyltransferase	-7,59	0,04	11	M
STM14_4480	<i>waaB</i>	UDP-D-galactose: (glucosyl)lipopolysaccharide-1, 6-D-galactosyltransferase	-7,54	0,02	39	M
STM14_4496	<i>rph</i>	ribonuclease PH	-4,71	0,01	3	J
STM14_4498	<i>yicC</i>	hypothetical protein	-6,09	0,02	4	S
STM14_4499	-	putative transcriptional regulator	-5,63	0,03	4	-
STM14_4503	<i>ligB</i>	NAD-dependent DNA ligase LigB	-5,02	0,03	7	L
STM14_4507	<i>spoT</i>	bifunctional (p)ppGpp synthetase II/ guanosine-3',5'-bis pyrophosphate 3'-pyrophosphohydrolase	-8,79	0,01	5	T
STM14_4514	<i>yicH</i>	putative inner membrane protein	-11,31	0,03	3	-
STM14_4515	<i>xylQ</i>	alpha-xylosidase YicI	-1,11	0,01	4	G
STM14_4519	-	putative cytoplasmic protein	-4,47	0,01	3	-
STM14_4522	<i>sugR</i>	ATP binding protein	-1,15	0,03	5	R
STM14_4524	<i>rhuM</i>	putative cytoplasmic protein	-4,86	0,03	5	R
STM14_4527	<i>misL</i>	putative autotransporte	-1,83	0,04	8	M
STM14_4528.RJ	<i>fidL</i>	Putative exported protein	-1,02	0,03	6	-
STM14_4529.J	<i>marT</i>	putative transcriptional regulatory protein	-8,06	0,01	9	-
STM14_4534.RJ	<i>cigR</i>	Putative inner membrane protein	-4,67	0,01	3	-
STM14_4536	<i>mgtB</i>	Mg2+ transporter	-9,27	0,02	4	P
STM14_4541.R	<i>yicL</i>	Uncharacterized inner membrane transporter yicL	-4,98	0,04	4	G
STM14_4550	<i>zraR</i>	putative transcriptional regulator	-4,81	0,02	6	-
STM14_4555	<i>nepl</i>	ribonucleoside transporter	-1,69	0,03	3	G
STM14_4559	<i>gatY</i>	putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase	-1,18	0,04	9	G
STM14_4560	-	putative sugar kinase	-11,27	0,02	24	-
STM14_4561	-	putative PTS system galactitol-specific enzyme IIC component	-11,57	0,04	28	G
STM14_4562	-	putative periplasmic protein	-3,83	0,03	3	G
STM14_4563	-	phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA component	-1,70	0,02	5	G
STM14_4564	-	putative regulatory protein	-4,55	0,02	3	-
STM14_4573	<i>fucP</i>	putative L-fucose permease	-4,61	0,03	4	G
STM14_4574	<i>rbsK</i>	putative sugar kinase	-2,23	0,01	5	G
STM14_4577	<i>ilvB</i>	acetolactate synthase catalytic subunit	-1,59	0,03	4	E
STM14_4585.RJ	-	Integral membrane protein	-5,22	0,04	3	-
STM14_4586	<i>emrD</i>	multidrug resistance protein D	-5,05	0,02	7	G
STM14_4588.RJ	<i>dsdC</i>	D-serine dehydratase transcriptional activator	-1,07	0,04	3	K
STM14_4591	<i>dsdA</i>	D-serine dehydratase	-7,56	0,00	3	E
STM14_4612	<i>yhjA</i>	putative cytochrome c peroxidase	-4,73	0,03	13	O
STM14_4613	<i>torD</i>	chaperone protein TorD	-8,10	0,05	3	R
STM14_4615	<i>torC</i>	trimethylamine N-oxide reductase cytochrome c-like subunit	-1,61	0,01	5	C
STM14_4618	<i>torS</i>	hybrid sensory histidine kinase TorS	-4,08	0,04	4	T
STM14_4620	<i>dgoA</i>	2-oxo-3-deoxygalactonate 6-phosphate aldolase/galactonate dehydratase	-1,72	0,04	3	M

STM14_4625	-	putative permease	-5,21	0,03	17	-
STM14_4626	-	putative mandelate racemase	-5,72	0,01	3	-
STM14_4640	-	putative inner membrane protein	-4,33	0,01	4	-
STM14_4647	<i>yieH</i>	6-phosphogluconate phosphatase	-1,72	0,02	4	R
STM14_4654	<i>aroE₃</i>	shikimate 5-dehydrogenase	-1,82	0,05	3	E
STM14_4655	<i>oppA</i>	putative dipeptide/oligopeptide/nickel ABC-type transport system periplasmic component	-4,27	0,03	6	-
STM14_4659	-	putative permease	-1,49	0,01	3	-
STM14_4677	<i>trkD</i>	potassium transport protein Kup	-1,70	0,00	6	P
STM14_4679.RJ	<i>rbsA</i>	Ribose ABC transport system	-1,05	0,05	3	G
STM14_4684	<i>hsrA</i>	putative transport protein	-1,67	0,04	6	-
STM14_4693	<i>hdfR</i>	transcriptional regulator HdfR	-4,83	0,00	6	K
STM14_4695	<i>comM</i>	putative ATP-dependent protease	-5,19	0,04	5	-
STM14_4698	<i>ilvG</i>	acetolactate synthase 2 catalytic subunit	-7,29	0,03	9	E
STM14_4712	<i>rhlB</i>	ATP-dependent RNA helicase RhlB degradation	-5,25	0,01	8	L
STM14_4717	<i>wzzE</i>	lipopolysaccharide biosynthesis protein WzzE	-8,05	0,03	3	M
STM14_4720	<i>rffG</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	-1,78	0,01	3	M
STM14_4728	<i>yifK</i>	putative transport protein YifK	-1,61	0,01	5	E
STM14_4734	<i>hemY</i>	putative protoheme IX biogenesis protein	-1,42	0,00	5	H
STM14_4735	<i>hemX</i>	putative uroporphyrinogen III C-methyltransferase	-4,13	0,01	4	H
STM14_4741.J	-	hypothetical protein	-3,73	0,00	3	-
STM14_4742	-	putative inner membrane protein	-5,65	0,02	4	-
STM14_4746	-	pseudogene	-1,16	0,01	3	-
STM14_4752	<i>uvrD</i>	DNA-dependent helicase II	-4,90	0,01	4	L
STM14_4757	<i>rarD</i>	chloramphenicol resistance	-4,84	0,04	5	R
STM14_4760	<i>pldA</i>	phospholipase A; catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine	-1,37	0,04	6	M
STM14_4761	<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ	-5,14	0,00	3	L
STM14_4764.LR	<i>pldB</i>	lysophospholipase L2	-5,23	0,05	6	I
STM14_4766	<i>yigM</i>	putative transport protein	-1,03	0,05	3	G
STM14_4767	<i>metR</i>	metE/metH regulator	-1,27	0,01	12	K
STM14_4769	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-- homocysteine methyltransferase	-4,23	0,01	21	E
STM14_4773	<i>dlhH</i>	putative dienelactone hydrolase	-5,03	0,04	3	Q
STM14_4775	<i>rmuC</i>	DNA recombination protein RmuC	-1,57	0,03	5	L
STM14_4780	<i>tatB</i>	sec-independent translocase	-4,73	0,02	3	U
STM14_4781	<i>tatC</i>	TatABCE protein translocation system subunit	-4,99	0,04	5	U
STM14_4787	<i>assT</i>	arylsulfotransferase	-1,26	0,00	13	-
STM14_4807	<i>yihG</i>	putative endonuclease	-1,96	0,03	8	I
STM14_4814	<i>yihI</i>	hypothetical protein	-6,25	0,01	3	S
STM14_4815.R	<i>hemN</i>	Coproporphyrinogen III oxidase	-7,91	0,00	4	H
STM14_4824	-	putative inner membrane protein	-4,85	0,02	4	-
STM14_4825	-	coproporphyrinogen III oxidase	-4,64	0,02	4	-
STM14_4826.RJ	-	Putative membrane-associated metal-dependent	-11,10	0,02	12	-

		hydrolase				
STM14_4827	-	putative periplasmic protein	-5,94	0,03	13	-
STM14_4828	-	putative cytoplasmic protein	-6,61	0,04	8	-
STM14_4830	<i>uidB</i> [J]_2	GPH family transport protein	-4,52	0,01	11	-
STM14_4831	<i>uidB</i> [J]_3	GPH family transport protein	-1,08	0,02	4	-
STM14_4834	<i>manC</i>	putative isomerase	-9,13	0,04	8	-
STM14_4841	<i>rbn</i>	ribonuclease BN	-5,14	0,02	3	S
STM14_4846	<i>estA</i>	putative acetyl esterase	-3,94	0,05	3	I
STM14_4849	<i>fdhE</i>	formate dehydrogenase accessory protein FdhE	-4,66	0,01	4	O
STM14_4851	<i>fdoH</i>	formate dehydrogenase-O beta subunit	-7,24	0,02	6	C
STM14_4852	<i>fdoG</i>	formate dehydrogenase alpha subunit	-1,37	0,01	11	C
STM14_4854	-	hypothetical protein	-1,34	0,00	3	-
STM14_4855	-	putative inner membrane lipoprotein	-4,85	0,04	21	-
STM14_4855.J	-	hypothetical protein	-1,60	0,03	3	-
STM14_4857.RJ	<i>yiiG</i>	Putative lipoprotein	-7,56	0,04	12	-
STM14_4858	-	hypothetical protein	-8,55	0,05	4	-
STM14_4860	<i>aziC</i>	putative branched-chain amino acid permease	-5,02	0,04	5	E
STM14_4863	<i>fucO</i>	putative alcohol dehydrogenase	-1,02	0,01	4	G
STM14_4866	<i>rhaB</i>	rhamnulokinase	-5,74	0,03	7	G
STM14_4871	<i>rhaT</i>	rhamnose-proton symporter	-10,42	0,02	4	G
STM14_4874	-	putative outer membrane protein	-5,62	0,01	8	-
STM14_4875	-	putative C4-dicarboxylate transport system	-5,38	0,03	11	C
STM14_4885	<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase	-10,96	0,05	3	G
STM14_4887	<i>sbp</i>	sulfate transporter subunit	-4,78	0,04	5	P
STM14_4888	<i>ushB</i>	CDP-diacylglycerol pyrophosphatase	-4,73	0,03	4	I
STM14_4889	<i>uidB</i> [J]_4	putative Na+/galactoside symporter	-5,33	0,04	5	-
STM14_4896	<i>IsrK</i>	autoinducer-2 (AI-2) kinase	-7,89	0,01	5	G
STM14_4897	<i>IsrR</i>	putative transcriptional repressor	-4,62	0,04	5	K
STM14_4900	<i>IsrC</i>	putative sugar transport protein	-7,12	0,04	5	G
STM14_4901	<i>IsrD</i>	putative sugar transport protein	-1,01	0,03	10	G
STM14_4902	<i>IsrB</i>	putative sugar transport protein	-4,41	0,03	9	G
STM14_4903	<i>IsrF</i>	aldolase	-7,46	0,01	12	G
STM14_4907	<i>yiiQ</i>	putative periplasmic protein	-1,14	0,00	3	-
STM14_4910	<i>fpr</i>	ferredoxin-NADP reductase	-7,01	0,03	3	C
STM14_4912	<i>glpK</i>	glycerol kinase	-4,87	0,04	6	C
STM14_4913	<i>glpF</i>	glycerol diffusion	-4,89	0,03	3	G
STM14_4918	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	-10,47	0,00	6	H
STM14_4919	<i>hslU</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	-8,23	0,01	5	O
STM14_4921	<i>ftsN</i>	essential cell division protein	-1,42	0,03	8	D
STM14_4926	-	putative arylsulfate sulfotransferase	-4,86	0,01	16	-
STM14_4928	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase	-8,11	0,03	3	E

STM14_4930	-	putative inner membrane protein	-11,60	0,05	11	-
STM14_4931	-	putative membrane protein	-1,88	0,01	12	-
STM14_4933	<i>ushA</i>	putative 5'-nucleotidase/2',3'-cyclic phosphodiesterase	-1,14	0,03	6	I
STM14_4936	<i>katG</i>	hydroperoxidase	-1,93	0,03	7	P
STM14_4944	<i>frwC</i>	putative fructose-like permease EIIc subunit 2	-5,23	0,01	4	G
STM14_4946	<i>pflD</i>	putative formate acetyltransferase 2	-1,49	0,01	5	C
STM14_4947	<i>pflC</i>	pyruvate formate lyase II activase	-7,71	0,03	3	O
STM14_4952	<i>yijP</i>	hypothetical protein	-1,82	0,05	4	R
STM14_4965.J	<i>btuB</i>	vitamin B12 transport protein	-1,65	0,04	6	H
STM14_4971	<i>rrlB</i>	Large Subunit Ribosomal RNA	-4,75	0,01	3	J
STM14_5010.P	-	-	-1,55	0,04	5	-
STM14_5011	<i>hupA</i>	transcriptional regulator HU subunit alpha; histone-like DNA-binding protein	-3,01	0,00	11	L
STM14_5015	<i>hydG</i>	transcriptional regulatory protein ZraR	-1,11	0,02	4	T
STM14_5016	<i>purD</i>	phosphoribosylamine--glycine ligase	-4,99	0,03	3	F
STM14_5029.R	<i>aceB</i>	Malate synthase	-9,34	0,04	4	C
STM14_5035	<i>methH</i>	B12-dependent methionine synthase	-8,47	0,03	4	-
STM14_5047	-	putative cytoplasmic protein	-4,94	0,01	3	-
STM14_5048	-	putative cytoplasmic protein	-8,08	0,02	7	-
STM14_5049	-	putative phage tail fiber protein H	-5,30	0,01	7	-
STM14_5050	-	putative phage tail protein	-5,89	0,02	3	-
STM14_5054	-	putative inner membrane protein	-8,18	0,03	7	-
STM14_5056	<i>rfbl</i>	putative phage glucose translocase	-4,88	0,05	3	-
STM14_5065	-	putative phage tail core protein	-7,77	0,02	3	-
STM14_5070	-	putative soluble lytic murein transglycosylase	-4,81	0,05	5	M
STM14_5079	<i>yjbH</i>	putative outer membrane lipoprotein	-1,82	0,01	5	-
STM14_5121	-	putative inner membrane protein	-9,61	0,03	86	-
STM14_5122	-	putative ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporter	-4,41	0,04	5	-
STM14_5126.J	<i>yjcC</i>	GGDEF family protein	-7,21	0,05	7	T
STM14_5135.R	<i>yjcE</i>	Putative Na(+)/H(+) exchanger protein	-4,47	0,04	5	P
STM14_5136	<i>cidR</i>	putative transcriptional regulator	-8,29	0,00	3	K
STM14_5139	<i>actP</i>	acetate permease	-11,81	0,00	3	R
STM14_5141	<i>acs</i>	acetyl-CoA synthetase	-4,52	0,04	4	I
STM14_5143	<i>nrfA</i>	cytochrome c nitrite reductase	-3,84	0,01	6	P
STM14_5147	<i>nrfE</i>	formate-dependent nitrite reductase	-7,22	0,05	8	O
STM14_5155	<i>fdhF</i>	formate dehydrogenase	-1,88	0,02	8	C
STM14_5161	<i>proP</i>	proline/glycine betaine transporter	-5,41	0,02	4	G
STM14_5166	<i>yjdE</i>	arginine:agmatin antiporter	-1,18	0,03	3	E
STM14_5167	<i>adiY</i>	transcriptional activator	-1,74	0,03	11	K
STM14_5169	<i>adi</i>	catabolic arginine decarboxylase	-1,63	0,05	7	E
STM14_5178	-	putative anaerobic dimethylsulfoxide reductase subunit A	-4,59	0,04	10	C
STM14_5182	-	hypothetical protein	-1,30	0,01	5	-

STM14_5184	-	putative inner membrane protein	-7,55	0,01	11	-
STM14_5185.J	-	putative phage protein	-10,05	0,03	7	-
STM14_5190	-	putative cytoplasmic protein	-7,09	0,05	8	-
STM14_5193	<i>phoN</i>	non-specific acid phosphatase	-7,86	0,02	4	I
STM14_5194	-	ethyl tert-butyl ether degradation EthD	-5,16	0,03	3	-
STM14_5199	<i>dipZ</i>	thiol:disulfide interchange protein precursor	-8,27	0,04	7	O
STM14_5202	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	-5,26	0,00	4	E
STM14_5204	<i>fxsA</i>	FxsA; F exclusion of bacteriophage T7	-1,83	0,04	3	R
STM14_5210	<i>yjeJ</i>	putative inner membrane protein	-10,41	0,05	9	-
STM14_5226	<i>yjeM</i>	putative amino-acid transport protein	-1,19	0,02	13	E
STM14_5228	<i>kefA</i>	hypothetical protein	-1,10	0,02	6	-
STM14_5239	<i>amiB</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase II	-1,92	0,00	4	M
STM14_5240	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein	-10,74	0,02	3	L
STM14_5243	<i>hflX</i>	putative GTPase HflX	-10,97	0,01	3	R
STM14_5244	<i>hflK</i>	FtsH protease regulator HflK	-7,65	0,02	19	O
STM14_5245	<i>hflC</i>	FtsH protease regulator HflC	-8,84	0,03	17	O
STM14_5249	<i>nsrR</i>	transcriptional repressor NsrR	-7,96	0,02	3	K
STM14_5253	<i>yjfJ</i>	putative phage shock protein A	-1,12	0,03	5	K
STM14_5256	<i>yjfl</i>	putative inner membrane protein	-1,65	0,03	3	S
STM14_5281.LR	<i>fkfB</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-8,59	0,00	4	O
STM14_5287	<i>cpdB</i>	bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase periplasmic precursor protein	-1,56	0,04	5	F
STM14_5294	<i>msrA</i>	methionine sulfoxide reductase A	-4,85	0,02	3	O
STM14_5299	-	putative permease	-4,01	0,01	8	-
STM14_5300	-	putative metallo-dependent hydrolase	-5,27	0,02	7	-
STM14_5317	-	putative dehydrogenase	-3,17	0,01	7	-
STM14_5325	-	putative permease	-3,24	0,03	3	-
STM14_5326	-	putative cytoplasmic protein	-6,57	0,05	3	-
STM14_5336	-	dihydroorotase	-7,13	0,04	3	F
STM14_5349.R	<i>mgtA</i>	Magnesium transporting ATPase	-1,18	0,03	6	P
STM14_5361	<i>arcA</i>	arginine deiminase	-8,59	0,04	6	E
STM14_5364	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase subunit I	-1,95	0,03	3	E
STM14_5369	<i>yjgM</i>	putative acetyltransferase	-9,49	0,00	7	K
STM14_5377	<i>idnR</i>	L-idonate regulator	-8,15	0,05	3	K
STM14_5379	<i>idnO</i>	gluconate 5-dehydrogenase	-2,27	0,04	4	Q
STM14_5380	<i>idnD</i>	L-idonate 5-dehydrogenase	-2,93	0,01	3	E
STM14_5383	<i>yjgB</i>	putative alcohol dehydrogenase	-5,48	0,02	3	R
STM14_5386	-	putative DNA helicase	-7,57	0,00	15	-
STM14_5389.R	-	putative cytoplasmic protein	-5,23	0,01	7	-
STM14_5392	-	putative type II restriction enzyme methylase subunit	-8,90	0,05	11	-
STM14_5393	-	putative DNA repair ATPase	-4,68	0,05	4	-
STM14_5398.J	<i>yeeN</i>	conserved hypothetical protein	-1,39	0,02	3	S

STM14_5399	-	hypothetical protein	-1,19	0,04	4	-
STM14_5403	-	putative cytoplasmic protein	-1,10	0,02	7	-
STM14_5404	-	putative inner membrane protein	-7,55	0,01	3	-
STM14_5436	<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme specificity protein	-3,22	0,04	5	V
STM14_5438	<i>hsdR</i>	type I restriction enzyme EcoKI subunit R	-1,01	0,05	3	V
STM14_5443	<i>yjiA</i>	putative GTP-binding protein YjiA	-4,98	0,04	3	R
STM14_5445	<i>cstA_2</i>	putative carbon starvation protein	-1,47	0,00	6	T
STM14_5452.RJ	-	PTS system, mannose-specific IID component	-3,99	0,02	3	-
STM14_5453	<i>glmS</i>	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	-5,10	0,01	8	M
STM14_5454	-	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	-7,26	0,02	4	-
STM14_5456	<i>mdoB</i>	phosphoglycerol transferase I	-1,35	0,02	4	M
STM14_5461.RJ	<i>yjiP</i>	Putative membrane protein	-10,67	0,03	4	S
STM14_5467	<i>pleD</i>	hypothetical protein	-4,09	0,01	3	-
STM14_5469.J	-	putative inner membrane protein	-3,41	0,04	3	-
STM14_5492	<i>stjB</i>	putative fimbrial usher protein	-1,63	0,04	6	N
STM14_5493	<i>stjC</i>	putative periplasmic chaperone protein	-1,08	0,03	5	N
STM14_5494	-	putative outer membrane protein	-5,57	0,05	5	-
STM14_5495	-	putative outer membrane protein	-7,07	0,02	5	-
STM14_5499	<i>serB</i>	phosphoserine phosphatase	-1,78	0,03	4	E
STM14_5501.LR J	<i>nadR</i>	NadR transcriptional regulator / Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase	-1,88	0,01	3	-
STM14_5510	<i>creC</i>	sensory histidine kinase CreC	-1,48	0,03	3	T
STM14_5512	<i>sthE</i>	putative major fimbrial subunit	-5,54	0,01	3	N
STM14_5513	<i>sthD</i>	putative fimbrial subunit	-1,86	0,03	3	N
STM14_5514	<i>sthB</i>	putative fimbrial usher protein	-1,23	0,05	8	N
STM14_5515	<i>sthA</i>	putative fimbrial chaparone	-8,33	0,01	5	N
STM14_5516	-	putative fimbrial chaparone	-8,36	0,03	5	-
STM14_5517	-	putative inner membrane protein	-1,84	0,02	4	-
STM14_5521	<i>lasT</i>	putative RNA methyltransferase	-7,88	0,00	4	J
STM14_5539	<i>orf6</i>	putative outer membrane protein	-9,33	0,02	3	-
STM14_5564	<i>spvR</i>	regulation of spv operon	-1,48	0,03	3	K
STM14_5592.J	<i>finP</i>	putative transglycosylase	-10,22	0,03	5	-
STM14_5621	<i>traT</i>	conjugative transfer: surface exclusion	-1,07	0,04	3	-

Tabla B. Lista de genes de *S. Typhimurium* requeridos para la supervivencia intracelular en macrófagos murinos RAW264.7 y la ameba *D. discoideum*. Parámetros de selección: $\text{Log}_2(T_6/T_0) \leq -1$; $P \leq 0,05$ y M: número de mutantes por gen.

Locus_Tag	Gen	Descripción o función	COGs	Macrófagos RAW264.7			<i>D. discoideum</i>		
				$\text{Log}_2(T_6/T_0)$	P	M	$\text{Log}_2(T_6/T_0)$	P	M
STM14_0016	-	putative transcriptional regulator	-	-4,33	0,01	6	-1,23	0,01	4
STM14_0041	-	putative arylsulfatase,	-	-5,85	0,04	18	-1,24	0,02	11
STM14_0051	<i>xynT</i>	putative sodium galactoside symporter	-	-1,40	0,05	5	-2,24	0,04	3
STM14_0063.J	<i>citA</i>	sensor kinase citA	T	-8,49	0,00	8	-5,68	0,00	4
STM14_0067	-	putative citrate-sodium symporter	-	-1,15	0,01	3	-1,62	0,01	3
STM14_0100	-	putative sulfatase	-	-5,88	0,01	13	-1,75	0,01	5
STM14_0417	<i>mod</i>	DNA methylase; type III restriction-modification system	L	-5,39	0,00	3	-5,38	0,02	3
STM14_0418	<i>res</i>	DNA restriction enzyme; type III restriction-modification system enzyme	-	-1,17	0,03	7	-1,00	0,04	3
STM14_0438	<i>yaiU</i>	flagellar protein	M	-8,06	0,02	10	-1,28	0,03	11
STM14_0439	<i>yaiV</i>	putative DNA-binding transcriptional regulator	-	-7,61	0,05	3	-4,86	0,04	4
STM14_0517	-	putative periplasmic protein	-	-1,79	0,05	7	-4,93	0,03	8
STM14_0518	-	TPR repeat-containing protein; TPR repeat	-	-7,38	0,00	7	-9,46	0,00	4
STM14_0544	<i>mdlA</i>	putative multidrug transporter membrane\ATP-binding component	V	-8,39	0,01	3	-1,44	0,04	4
STM14_0614	<i>ybbY</i>	putative purine permease YbbY	F	-1,14	0,02	3	-1,87	0,04	3
STM14_0667	-	putative inner membrane protein	-	-1,38	0,04	3	-1,36	0,02	3
STM14_0687	<i>fepE</i>	ferric enterobactin transport protein FepE	M	-1,03	0,04	4	-1,49	0,00	12
STM14_0725	<i>citC</i>	citrate lyase synthetase	C	-8,13	0,01	5	-7,83	0,02	3
STM14_0729	<i>dcuC</i>	C4-dicarboxylate transporter DcuC	C	-1,40	0,03	5	-4,67	0,04	5
STM14_0760	<i>fleQ</i>	putative sigma-54 dependent transcriptional regulator	K	-4,52	0,02	6	-1,20	0,03	6
STM14_0767	<i>hscC</i>	putative heatshock protein	O	-6,05	0,01	4	-2,65	0,00	4
STM14_0928	<i>slrP</i>	leucine-rich repeat-containing protein	-	-7,70	0,02	8	-5,17	0,03	3
STM14_1005	<i>acd-6</i>	putative acyl-CoA dehydrogenase	I	-11,53	0,00	3	-1,22	0,04	3
STM14_1007	-	putative dehydrogenase	C	-7,52	0,02	5	-7,18	0,01	6
STM14_1095	<i>xasA</i>	putative amino-acid transporter	E	-10,59	0,04	5	-1,13	0,02	7
STM14_1105	<i>serC</i>	phosphoserine aminotransferase	H	-5,29	0,04	6	-1,01	0,04	3
STM14_1138	-	putative transcriptional regulator	-	-8,09	0,02	4	-6,65	0,04	3
STM14_1287	-	putative sodium/glucose cotransporter	-	-1,29	0,05	5	-2,66	0,00	3
STM14_1295	<i>nanT</i>	putative sialic acid transporter	-	-8,53	0,00	3	-8,20	0,03	3
STM14_1475	-	host specificity protein	-	-8,85	0,00	4	-1,66	0,04	3
STM14_2431	-	hypothetical protein	-	-7,91	0,03	3	-2,49	0,02	5
STM14_2491	-	TPR repeat-containing protein	-	-1,32	0,00	5	-8,69	0,00	4
STM14_2575	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase	G	-5,33	0,05	5	-1,80	0,00	3
STM14_2576	<i>wbaP</i>	undecaprenol-phosphate galactosephosphotransferase/O-antigen transferase	M	-4,88	0,04	7	-12,83	0,04	25

STM14_2577	<i>wbaK</i>	phosphomannomutase	G	-5,20	0,03	16	-6,59	0,02	89
STM14_2578	<i>wbaM</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	M	-1,57	0,02	5	-8,81	0,02	15
STM14_2579	<i>wbaN</i>	rhamnosyl transferase	M	-5,22	0,01	6	-12,21	0,00	15
STM14_2588	<i>wbaC</i>	dTDP-4,deoxyrhamnose 3,5 epimerase	M	-4,91	0,04	4	-9,20	0,03	12
STM14_2590	<i>wbaD</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	M	-3,27	0,01	3	-11,53	0,04	20
STM14_2630.R J	-	Putative cytoplasmic protein	-	-7,43	0,01	3	-4,90	0,03	5
STM14_2653	<i>stcC</i>	putative outer membrane protein	N	-4,92	0,03	9	-5,99	0,04	7
STM14_2696	<i>mglA</i>	galactose/methyl galactoside transporter ATP-binding protein	G	-5,15	0,00	3	-7,55	0,00	4
STM14_2758	<i>oafA</i>	O-antigen acetylase	I	-1,85	0,05	16	-5,41	0,05	18
STM14_2809	-	putative regulatory protein	-	-2,25	0,00	3	-5,31	0,00	6
STM14_2946	<i>pgtE</i>	outer membrane protease	M	-5,41	0,03	5	-1,26	0,04	10
STM14_3068	<i>yfgF</i>	putative diguanylate cyclase	-	-6,95	0,03	5	-1,03	0,00	3
STM14_3082.J	<i>ratB</i>	putative outer membrane protein	-	-8,12	0,02	3	-2,60	0,02	4
STM14_3105	-	putative inner membrane lipoprotein	-	-5,22	0,01	7	-1,34	0,03	5
STM14_3153	<i>panE</i>	2-dehydropantoate 2-reductase	Q	-8,30	0,02	8	-5,33	0,01	5
STM14_3154	-	putative permease	-	-2,66	0,05	4	-1,40	0,00	4
STM14_3155	<i>cynR</i>	putative transcriptional regulator	K	-1,24	0,03	3	-1,04	0,04	3
STM14_3169	<i>mig-3</i>	phage tail assembly-like protein	-	-1,06	0,00	5	-1,37	0,05	3
STM14_3297	-	pseudogene	-	-7,48	0,03	14	-7,59	0,03	7
STM14_3345	<i>iroC</i>	putative ABC transporter protein	V	-1,16	0,05	5	-5,50	0,00	3
STM14_3348	<i>iroN</i>	outer membrane receptor of ferric enterobactin and colicins B and D	P	-1,98	0,01	6	-4,25	0,04	3
STM14_3391	<i>proV</i>	glycine betaine transporter ATP- binding subunit	E	-7,34	0,04	11	-1,31	0,05	5
STM14_3474	<i>hilD</i>	invasion protein regulatory protein	K	-11,11	0,01	8	-9,66	0,01	3
STM14_3475	<i>hilA</i>	invasion protein regulator	K	-6,77	0,04	14	-7,94	0,03	6
STM14_3477	<i>sptP</i>	protein tyrosine phosphatase/GTPase activating protein	-	-4,13	0,03	9	-8,47	0,02	4
STM14_3481	<i>sipA</i>	secreted effector protein	-	-5,60	0,02	14	-1,29	0,01	4
STM14_3483	<i>sipC</i>	translocation machinery component	-	-2,13	0,04	11	-1,64	0,05	3
STM14_3487	<i>spaR</i>	needle complex export protein	U	-8,21	0,00	5	-1,04	0,05	3
STM14_3495	<i>invA</i>	needle complex export protein	U	-9,41	0,01	26	-3,75	0,05	11
STM14_3497	<i>invG</i>	outer membrane secretin precursor	N	-8,10	0,04	14	-8,31	0,02	5
STM14_3498.J	<i>invF</i>	invasion protein	K	-4,62	0,03	6	-4,35	0,05	3
STM14_3570	<i>gudT</i>	putative D-glucarate permease	G	-1,91	0,03	3	-4,70	0,01	3
STM14_3610	<i>ptr</i>	protease III	O	-1,55	0,01	4	-1,02	0,05	4
STM14_3632	<i>tas</i>	putative aldo-keto reductase	C	-1,16	0,01	4	-1,28	0,01	3
STM14_3650	<i>sdaC_2</i>	putative transport protein	E	-4,96	0,02	12	-1,64	0,02	5
STM14_3660	-	hypothetical protein	-	-1,82	0,04	4	-7,85	0,05	4
STM14_3661	<i>rcK</i>	Ail/OmpX-like protein	-	-5,30	0,02	4	-2,17	0,02	6
STM14_3685	-	putative outer membrane protein	-	-1,85	0,03	7	-9,43	0,04	6
STM14_3687.J	<i>gcvP</i>	glycine dehydrogenase	E	-4,53	0,01	5	-1,24	0,04	4
STM14_3724	-	putative malate/L-lactate	-	-7,21	0,02	4	-1,38	0,02	3

		dehydrogenase							
STM14_3767	<i>abfT-1</i>	putative acetyl-CoA hydrolase	I	-4,42	0,03	6	-1,01	0,02	3
STM14_3775.R	-	Putative response regulator	-	-1,38	0,01	5	-2,45	0,04	3
STM14_3777	-	putative amino acid transporter	-	-5,08	0,02	3	-8,16	0,00	5
STM14_3787	-	putative xylanase/chitin deacetylase	-	-4,77	0,04	5	-1,16	0,04	3
STM14_3788	-	putative amidohydrolase	-	-11,26	0,03	5	-1,60	0,05	4
STM14_3799	-	putative methyl-accepting chemotaxis protein	-	-4,50	0,04	4	-4,83	0,03	3
STM14_3820	-	putative ATP-dependent RNA helicase-like protein	-	-3,87	0,05	3	-4,52	0,04	3
STM14_3828	<i>yghB</i>	hypothetical protein	S	-1,85	0,00	4	-2,98	0,01	5
STM14_3862	<i>ygiC</i>	putative glutathionylspermidine synthase	E	-1,65	0,03	3	-2,35	0,05	3
STM14_3877	<i>glnE</i>	bifunctional glutamine-synthetase adenylyltransferase/deadenyltransferase	O	-8,18	0,04	9	-1,57	0,03	7
STM14_3924	<i>tdcD</i>	propionate/acetate kinase	C	-1,17	0,01	6	-1,15	0,03	4
STM14_3925	<i>tdcC</i>	threonine/serine transporter TdcC	E	-7,67	0,04	3	-10,47	0,00	5
STM14_3926	<i>tdcB</i>	threonine dehydratase	E	-4,85	0,02	7	-1,70	0,03	4
STM14_3945	<i>yraL</i>	putative methyltransferase	R	-1,31	0,05	7	-4,66	0,04	5
STM14_4046	<i>fum-1</i>	L(+)-tartrate dehydratase subunit beta	G	-4,92	0,01	7	-4,69	0,05	5
STM14_4062	<i>tldD</i>	protease TldD	R	-1,07	0,04	4	-2,58	0,02	5
STM14_4064	<i>cafA</i>	ribonuclease G	J	-9,41	0,03	3	-1,89	0,01	3
STM14_4091	<i>acrF</i>	multidrug transport protein	V	-5,28	0,01	9	-1,34	0,04	3
STM14_4108	<i>smf</i>	hypothetical protein	L	-1,00	0,04	8	-1,04	0,01	3
STM14_4181	<i>tsgA</i>	hypothetical protein	-	-1,53	0,03	4	-1,10	0,02	3
STM14_4188	<i>bigA</i>	putative surface-exposed virulence protein	-	-1,28	0,02	18	-4,23	0,04	9
STM14_4215	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	C	-4,07	0,04	4	-1,40	0,02	4
STM14_4219.R J	<i>yhgF</i>	Transcription accessory protein (S1 RNA-binding domain)	K	-8,56	0,02	3	-7,32	0,00	3
STM14_4222	<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B	P	-1,37	0,04	23	-4,72	0,03	3
STM14_4232	<i>malP</i>	maltodextrin phosphorylase	G	-5,39	0,02	6	-5,44	0,05	4
STM14_4251	<i>ilvD</i>	putative dihydroxyacid dehydratase	E	-2,90	0,05	4	-1,45	0,01	4
STM14_4252	-	putative dihydrodipicolinate synthetase	-	-7,85	0,01	17	-6,78	0,01	5
STM14_4253	-	putative transcriptional regulator	-	-4,63	0,03	3	-1,55	0,02	4
STM14_4273	-	putative cytoplasmic protein	-	-11,19	0,00	14	-4,86	0,04	10
STM14_4304	<i>zntA</i>	zinc/cadmium/mercury/lead-transporting ATPase	P	-5,46	0,04	4	-2,66	0,01	5
STM14_4323	<i>prlC</i>	oligopeptidase A	E	-8,86	0,02	9	-1,19	0,01	4
STM14_4329	<i>dcuB</i>	anaerobic C4-dicarboxylate transporter	G	-4,34	0,04	16	-2,45	0,03	6
STM14_4330	-	putative sugar kinase	-	-1,33	0,04	5	-5,70	0,00	8
STM14_4338	<i>yhjB</i>	putative transcriptional regulator	T	-7,39	0,01	8	-10,10	0,00	6
STM14_4351	<i>dctA</i>	C4-dicarboxylate transporter DctA	C	-2,70	0,00	5	-2,81	0,00	5
STM14_4356	<i>bcsC</i>	endo-1,4-D-glucanase	G	-4,45	0,01	3	-5,04	0,02	3
STM14_4369	<i>yhjV</i>	putative transport protein	E	-4,83	0,02	24	-1,55	0,04	17
STM14_4372	<i>dppC_2</i>	dipeptide transporter	-	-1,64	0,03	6	-1,02	0,04	5

STM14_4384	<i>lpfD</i>	LpfD protein precursor	N	-1,25	0,05	12	-1,12	0,01	4
STM14_4400	-	hypothetical protein	-	-9,99	0,01	3	-4,56	0,04	4
STM14_4411	<i>yiaH</i>	putative inner membrane protein	S	-10,41	0,05	16	-2,70	0,03	6
STM14_4412	<i>yiaB</i>	putative inner membrane protein	S	-7,97	0,03	7	-6,99	0,00	3
STM14_4427	-	putative chemotaxis protein	-	-1,15	0,02	7	-4,43	0,05	5
STM14_4428	<i>yiaM</i>	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transporter small permease protein YiaM	G	-2,86	0,01	6	-6,51	0,01	3
STM14_4429	<i>yiaN</i>	hypothetical protein	G	-1,94	0,04	5	-1,24	0,04	5
STM14_4450	-	putative inner membrane protein	-	-4,44	0,04	13	-5,33	0,02	6
STM14_4453	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase	C	-4,77	0,01	3	-4,62	0,04	3
STM14_4457	-	putative mandelate racemase	-	-10,37	0,03	4	-1,87	0,01	3
STM14_4458	-	putative permease	-	-7,89	0,03	14	-4,85	0,03	3
STM14_4467	<i>yibD</i>	glycosyl transferase	M	-11,34	0,02	9	-1,18	0,05	6
STM14_4474	<i>waaL</i>	O-antigen ligase	M	-1,41	0,04	26	-9,23	0,00	85
STM14_4476	<i>waaZ</i>	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	-	-5,04	0,03	12	-1,06	0,04	4
STM14_4478	<i>waaJ</i>	lipopolysaccharide glucosyltransferase	M	-7,28	0,01	6	-10,06	0,00	16
STM14_4479.J	<i>waaI</i>	lipopolysaccharide 1,3-galactosyltransferase	M	-7,59	0,04	11	-9,02	0,01	11
STM14_4480	<i>waaB</i>	UDP-D-galactose:(glucosyl)lipopolysaccharide -1, 6-D-galactosyltransferase	M	-7,54	0,02	39	-4,32	0,05	3
STM14_4507	<i>spoT</i>	bifunctional (p)ppGpp synthetase II/ guanosine-3', 5'-bis pyrophosphate 3'-pyrophosphohydrolase	T	-8,79	0,01	5	-4,72	0,03	10
STM14_4519	-	putative cytoplasmic protein	-	-4,47	0,01	3	-2,26	0,01	4
STM14_4524	<i>rhuM</i>	putative cytoplasmic protein	R	-4,86	0,03	5	-6,32	0,02	5
STM14_4527	<i>misL</i>	putative autotransporter	M	-1,83	0,04	8	-4,46	0,03	3
STM14_4529.J	<i>marT</i>	putative transcriptional regulatory protein	-	-8,06	0,01	9	-1,56	0,04	3
STM14_4536	<i>mgtB</i>	Mg2+ transporter	P	-9,27	0,02	4	-5,45	0,02	29
STM14_4550	<i>zraR</i>	putative transcriptional regulator	-	-4,81	0,02	6	-1,06	0,02	5
STM14_4559	<i>gatY</i>	putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase	G	-1,18	0,04	9	-4,41	0,01	3
STM14_4560	-	putative sugar kinase	-	-11,27	0,02	24	-1,04	0,00	9
STM14_4561	-	putative PTS system galactitol-specific enzyme IIC component	G	-11,57	0,04	28	-4,68	0,03	6
STM14_4564	-	putative regulatory protein	-	-4,55	0,02	3	-6,85	0,02	3
STM14_4591	<i>dsdA</i>	D-serine dehydratase	E	-7,56	0,00	3	-4,42	0,02	3
STM14_4612	<i>yhjA</i>	putative cytochrome c peroxidase	O	-4,73	0,03	13	-1,78	0,03	13
STM14_4613	<i>torD</i>	chaperone protein TorD	R	-8,10	0,05	3	-1,80	0,03	3
STM14_4625	-	putative permease	-	-5,21	0,03	17	-1,17	0,01	7
STM14_4640	-	putative inner membrane protein	-	-4,33	0,01	4	-6,07	0,05	3
STM14_4677	<i>trkD</i>	potassium transport protein Kup	P	-1,70	0,00	6	-1,66	0,02	8
STM14_4693	<i>hdfR</i>	transcriptional regulator HdfR	K	-4,83	0,00	6	-9,63	0,01	5
STM14_4712	<i>rhlB</i>	ATP-dependent RNA helicase RhlB	L	-5,25	0,01	8	-4,89	0,02	5
STM14_4717	<i>wzzE</i>	lipopolysaccharide biosynthesis protein WzzE	M	-8,05	0,03	3	-2,60	0,02	4
STM14_4734	<i>hemY</i>	putative protoheme IX biogenesis	H	-1,42	0,00	5	-1,52	0,02	3

		protein							
STM14_4735	<i>hemX</i>	putative uroporphyrinogen III C-methyltransferase	H	-4,13	0,01	4	-7,62	0,05	3
STM14_4742	-	putative inner membrane protein	-	-5,65	0,02	4	-1,08	0,01	4
STM14_4775	<i>rmuC</i>	DNA recombination protein RmuC	L	-1,57	0,03	5	-2,26	0,04	4
STM14_4787	<i>assT</i>	arylsulfotransferase	-	-1,26	0,00	13	-8,18	0,02	6
STM14_4825	-	coproporphyrinogen III oxidase	-	-4,64	0,02	4	-1,78	0,00	3
STM14_4826.R J	-	Putative membrane-associated metal-dependent hydrolase	-	-11,10	0,02	12	-9,57	0,00	10
STM14_4827	-	putative periplasmic protein	-	-5,94	0,03	13	-1,03	0,05	4
STM14_4828	-	putative cytoplasmic protein	-	-6,61	0,04	8	-5,36	0,03	4
STM14_4830	<i>uidB</i>	GPH family transport protein	-	-4,52	0,01	11	-4,72	0,05	7
STM14_4855	-	putative inner membrane lipoprotein	-	-4,85	0,04	21	-4,98	0,01	10
STM14_4857.R J	<i>yjiG</i>	Putative lipoprotein	-	-7,56	0,04	12	-9,89	0,04	7
STM14_4858	-	hypothetical protein	-	-8,55	0,05	4	-9,99	0,03	3
STM14_4874	-	putative outer membrane protein	-	-5,62	0,01	8	-8,69	0,05	7
STM14_4875	-	putative C4-dicarboxylate transport system	C	-5,38	0,03	11	-9,13	0,01	6
STM14_4889	<i>uidB</i>	putative Na ⁺ /galactoside symporter	-	-5,33	0,04	5	-2,23	0,02	7
STM14_4901	<i>lsrD</i>	putative sugar transport protein	G	-1,01	0,03	10	-1,11	0,02	4
STM14_4902	<i>lsrB</i>	putative sugar transport protein	G	-4,41	0,03	9	-1,02	0,05	3
STM14_4903	<i>lsrF</i>	aldolase	G	-7,46	0,01	12	-7,32	0,04	7
STM14_4918	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	H	-10,47	0,00	6	-4,44	0,05	4
STM14_4919	<i>hslU</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	O	-8,23	0,01	5	-1,28	0,00	7
STM14_4926	-	putative arylsulfate sulfotransferase	-	-4,86	0,01	16	-1,65	0,04	7
STM14_4928	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase	E	-8,11	0,03	3	-1,34	0,03	3
STM14_4930	-	putative inner membrane protein	-	-11,60	0,05	11	-6,94	0,01	7
STM14_4931	-	putative membrane protein	-	-1,88	0,01	12	-5,05	0,04	10
STM14_4933	<i>ushA</i>	putative 5'-nucleotidase/2',3'-cyclic phosphodiesterase	I	-1,14	0,03	6	-1,04	0,01	4
STM14_4944	<i>frwC</i>	putative fructose-like permease EIIC subunit 2	G	-5,23	0,01	4	-1,33	0,04	3
STM14_4952	<i>yjiP</i>	hypothetical protein	R	-1,82	0,05	4	-1,16	0,03	6
STM14_5049	-	putative phage tail fiber protein H	-	-5,30	0,01	7	-5,39	0,00	6
STM14_5054	-	putative inner membrane protein	-	-8,18	0,03	7	-8,83	0,05	5
STM14_5070	-	putative soluble lytic murein transglycosylase	M	-4,81	0,05	5	-1,35	0,00	3
STM14_5121	-	putative inner membrane protein	-	-9,61	0,03	86	-1,01	0,02	60
STM14_5122	-	putative ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporter	-	-4,41	0,04	5	-1,16	0,01	4
STM14_5126.J	<i>yjcC</i>	GGDEF family protein	T	-7,21	0,05	7	-7,71	0,03	6
STM14_5155	<i>fdhF</i>	formate dehydrogenase	C	-1,88	0,02	8	-1,27	0,03	5
STM14_5166	<i>yjdE</i>	arginine:agmatin antiporter	E	-1,18	0,03	3	-2,58	0,01	4
STM14_5167	<i>adiY</i>	transcriptional activator	K	-1,74	0,03	11	-1,19	0,04	4
STM14_5178	-	putative anaerobic dimethylsulfoxide reductase subunit A	C	-4,59	0,04	10	-1,55	0,04	6
STM14_5184	-	putative inner membrane protein	-	-7,55	0,01	11	-7,37	0,03	5

STM14_5185.J	-	putative phage protein	-	-10,05	0,03	7	-4,39	0,02	3
STM14_5193	<i>phoN</i>	non-specific acid phosphatase	I	-7,86	0,02	4	-9,16	0,01	6
STM14_5202	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	E	-5,26	0,00	4	-1,64	0,04	3
STM14_5210	<i>yjeJ</i>	putative inner membrane protein	-	-10,41	0,05	9	-1,15	0,01	4
STM14_5226	<i>yjeM</i>	putative amino-acid transport protein	E	-1,19	0,02	13	-4,95	0,02	4
STM14_5228	<i>kefA</i>	hypothetical protein	-	-1,10	0,02	6	-1,45	0,04	4
STM14_5240	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein	L	-10,74	0,02	3	-1,08	0,05	4
STM14_5244	<i>hflK</i>	FtsH protease regulator HflK	O	-7,65	0,02	19	-2,55	0,05	3
STM14_5256	<i>yjfl</i>	putative inner membrane protein	S	-1,65	0,03	3	-1,37	0,01	3
STM14_5299	-	putative permease	-	-4,01	0,01	8	-5,15	0,03	3
STM14_5300	-	putative metallo-dependent hydrolase	-	-5,27	0,02	7	-8,43	0,04	5
STM14_5369	<i>yjgM</i>	putative acetyltransferase	K	-9,49	0,00	7	-1,05	0,01	7
STM14_5380	<i>idnD</i>	L-idonate 5-dehydrogenase	E	-2,93	0,01	3	-8,47	0,03	4
STM14_5386	-	putative DNA helicase	-	-7,57	0,00	15	-1,18	0,02	10
STM14_5392	-	putative type II restriction enzyme methylase subunit	-	-8,90	0,05	11	-1,05	0,01	5
STM14_5453	<i>glmS</i>	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	M	-5,10	0,01	8	-1,45	0,00	3
STM14_5454	-	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	-	-7,26	0,02	4	-9,83	0,05	3
STM14_5493	<i>stjC</i>	putative periplasmic chaperone protein	N	-1,08	0,03	5	-2,08	0,05	5
STM14_5514	<i>sthB</i>	putative fimbrial usher protein	N	-1,23	0,05	8	-2,05	0,04	3
STM14_5515	<i>sthA</i>	putative fimbrial chaparone	N	-8,33	0,01	5	-8,18	0,02	3
STM14_5516	-	putative fimbrial chaparone	-	-8,36	0,03	5	-9,46	0,00	3
STM14_5517	-	putative inner membrane protein	-	-1,84	0,02	4	-2,23	0,02	3
STM14_5539	<i>orf6</i>	putative outer membrane protein	-	-9,33	0,02	3	-1,50	0,02	3
STM14_5564	<i>spvR</i>	regulation of spv operon	K	-1,48	0,03	3	-1,26	0,02	10
STM14_5592.J	<i>finP</i>	putative transglycosylase	-	-10,22	0,03	5	-8,02	0,01	11
STM14_5621	<i>traT</i>	conjugative transfer	-	-1,07	0,04	3	-1,35	0,00	3