

UCH-FC

DOC-B

M449

Cr 1

**RELACION DE ALGUNAS PROTEINAS DE LA
MEMBRANA EXTERNA DE *Salmonella typhi* Ty2
INDUCIDAS EN ANAEROBIOSIS CON EL PROCESO DE
INVASION A CELULAS EPITELIALES HUMANAS *in vitro***

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Nancy Paula Maulén Lagos

Agosto, 1999

Director de Tesis: Dr. Guido C. Mora Longa

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

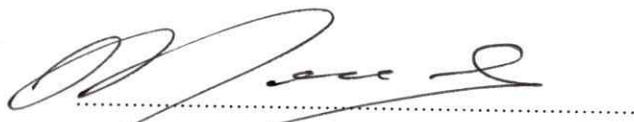
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Nancy Paula Maulén Lagos

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 11, de Agosto de 1999.

Director de Tesis:

Dr. Guido C. Mora Longa



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Margarita Carú



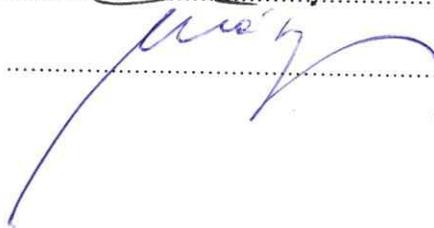
Dr. David Holmes

David S. Holmes

Dr. Carlos Jerez



Dr. Claudio Vásquez



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

La Srta. Nancy Maulén Lagos, fue beneficiaria de la beca CONICYT para estudiantes de Doctorado, durante el período 1995 a 1998.

Las investigaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis fueron financiadas por los proyectos FONDECYT 2970038 (a N. M. L.), FONDECYT 1960255 (a G. M. L.) y proyecto de postgrado de la Universidad de Chile PG/036/97 (a N. M. L.)

A mis padres.

Por darme su cariño, constante estímulo e incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en forma muy especial al Dr. Guido Mora Longa por haberme recibido en su laboratorio, brindarme su amistad y confianza necesarias para desarrollar mis ideas, discutir inquietudes e interés, entre otros tantos detalles, que finalmente se ven concretados en este trabajo de tesis.

Al Dr. Stanley Maloy de la Universidad de Illinois, donde se realizó parte de este trabajo, por su generosa y desinteresada colaboración, por su optimismo, constante estímulo y valiosos consejos.

A los integrantes de la comisión de evaluación de esta tesis, Dres. Margarita Carú, Claudio Vásquez, David Holmes y Carlos Jerez. Gracias por sus valiosas críticas y sugerencias que contribuyeron a mejorar el contenido y forma de esta tesis. En forma especial, a Rosalba Lagos, quien además me brindó apoyo durante los inicios de este programa de doctorado.

A la Dra. María Inés Becker, por su optimismo, generosidad y valiosa amistad.

Al Dr. Frank Masiarz de Chiron Corporation, por su colaboración en la obtención de las secuencias N-terminales de las proteínas estudiadas.

Al Sr. Víctor Ahumada por su constante colaboración, disposición y ayuda en el día a día del quehacer de nuestro laboratorio. Junto a él a todo el personal de apoyo técnico y administrativo de la Unidad de Microbiología, José Peña, Orlando Ortíz, Honorindo, Angélica Espinoza y Maritza Zúñiga.

A Gabriela Méndez, Directora del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. U. C. de Chile, por su colaboración en la manipulación y mantención de los animales utilizados en este estudio.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Microbiología, con los que compartí experiencias, largas jornadas de trabajo y buenos momentos. En especial a: Claudio Alarcón, Silvana Arenillas, Carolina Barnett, Karen Bittner, Pascale Clement, Loretto Contreras, Dr. Jorge Delgado, Dr. Bernardo González, Dra. Leda Guzmán, Valeria Matus, Carlos Santiviago, Dra. Cecilia Toro y Gonzalo Troncoso.

A mi familia y a Marcelo, por apoyarme siempre y por lo mucho que significan para mí.

INDICE DE MATERIAS

INDICE.....	v
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUCCION.....	1
2. HIPOTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	17
3.2.1. Aislamiento de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 inducidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico y análisis en electroforesis uni y bidimensional.....	17
3.2.2. Selección e identificación de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 mayormente inducidas en anaerobiosis.....	17
3.2.3. Construcción de la mutante de <i>S. typhi</i> afectada en la proteína de la ME de interés, mediante genética reversa.....	18
3.2.4. Construcción de una cepa <i>S. typhimurium</i> patogénica con una mutación homóloga a la de <i>S. typhi</i> , para determinar el efecto de dicha mutación en ensayos de virulencia <i>in vivo</i>	18
3.2.5. Evaluación del fenotipo invasor de las mutantes generadas por genética reversa, sobre células epiteliales HEp-2 en cultivo.....	18
3.2.6. Obtención de una colección de <i>S. typhi</i> mutantes mediante inserción del transposón <i>TnphoA</i>	18

4.	MATERIALES Y METODOS.....	20
4.1.	Material biológico.....	20
4.1.2.	Cepas bacterianas.....	20
4.1.2.	Plasmidios.....	22
4.1.3	Bacteriófagos.....	23
4.2.	Condiciones de cultivo bacteriano.....	23
4.3.	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	24
4.4.	Caracterización de las proteínas de la membrana externa (ME).....	25
4.4.1.	Obtención de la fracción de ME.....	25
4.4.2.	Determinación de proteínas.....	28
4.4.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, unidimensionales (1-D).....	28
4.4.4.	Análisis del perfil electroforético (1-D) de las proteínas de la ME.....	30
4.4.5.	Electroforesis en geles bidimensionales (2-D) de las proteínas de la ME.....	30
4.4.6.	Marcación <i>in vivo</i> de las proteínas de superficie de <i>S. typhi</i> con NHS-Biotina...32	
4.5.	Identificación de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> inducidas en anaerobiosis.....	34
4.5.1.	Transferencia de proteínas a membrana PVDF y secuenciación N-terminal.....	34
4.5.2	Análisis de las secuencias N-terminales de las proteínas seleccionadas.....	35
4.6.	Técnicas de genética bacteriana.....	35
4.6.1.	Construcción de <i>S. typhi</i> Ty2 mutante en el gen <i>aipI</i> y <i>S. typhimurium</i> 14028s mutante en el gen <i>adhE</i>	35
4.6.2.	Caracterización de las mutantes TYT2006 y NPM1.....	36
4.6.2.1.	Curva de crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis.....	36
4.6.2.2.	Batería bioquímica, movilidad y LPS.....	36

4.6.3. Obtención de una colección de fusiones génicas mediante inserción del transposón <i>TnphoA</i> en el cromosoma de <i>S. typhi</i>	37
4.6.3.1. Selección de fusiones génicas, mutantes putativas en proteínas de membrana.....	38
4.6.3.2. Selección de fusiones génicas XP ⁺ reguladas por anaerobiosis. Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.....	41
4.6.4. Construcción de <i>S. typhi</i> <i>ims50::Tn10</i> , mutante en un gen con similitud a <i>adhE</i> de <i>E. coli</i>	42
4.6.5. Preparación de lisados del fago P22Hint.....	43
4.6.6. Preparación de lisados MudP22.....	43
4.6.7. Transducciones.....	44
4.6.8. Transferencia de marcadores genéticos entre cepas de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i> mediante electrotransformación.....	45
4.7. Técnicas moleculares.....	46
4.7.1. Clonamiento de la región 5' de los genes <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> y <i>adhE</i> de <i>S. typhimurium</i> en pBluescript y pGP704.....	46
4.7.2. Secuenciación de los productos de amplificación del gen <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> y <i>adhE</i> de <i>S. typhimurium</i>	48
4.7.3. Obtención de DNA plasmidial.....	50
4.7.4. Obtención de DNA cromosomal.....	51
4.7.5. Electroporación.....	52
4.7.6. Ensayos de hibridación Southern blot y marcación de las sondas de DNA.....	53
4.7.6.1. Transferencia de DNA a membrana de nylon.....	53
4.7.6.2. Marcación radiactiva de la sonda <i>aipI</i>	54
4.7.6.3. Marcación no radiactiva de la sonda <i>aipI</i>	55
4.7.6.4. Hibridación Southern radiactivo.....	55
4.7.6.5. Hibridación Southern no radiactivo.....	56

4.7.7.	Digestión del DNA cromosomal y plasmidial con enzimas de restricción.....	57
4.7.8.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	58
4.8.	Ensayo de invasión en la línea celular epitelial humana HEp-2.....	58
4.9.	Determinación de LD ₅₀ en el modelo animal ratón.....	59
4.10.	Medición de la actividad alcohol deshidrogenasa de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i>	60
4.11.	Producción de antisuero anti proteína AipI de <i>S. typhi</i> Ty2.....	63
4.12.	Análisis Western blot de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 con suero policlonal anti AipI.....	64
4.13.	Ensayos de inmunofluorescencia indirecta con bacterias vivas.....	65
5.	RESULTADOS.....	66
5.1.	Caracterización de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i>	66
5.1.1.	Aislamiento de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 cultivada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas.....	66
5.1.2.	Selección de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> mayormente inducidas en anaerobiosis mediante análisis densitométrico.....	70
5.1.3.	Marcación de las proteínas de superficie de <i>S. typhi</i> Ty2 crecida en aerobiosis y anaerobiosis con el reactivo NHS-biotina.....	70
5.1.4.	Análisis de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 en geles bidimensionales.....	74
5.2.	Identificación de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> inducidas en anaerobiosis.....	76
5.2.1.	Obtención de las secuencias de aminoácidos N-terminales y análisis en el programa BlastP.....	76
5.3.	Mutagénesis del gen <i>aipI</i> mediante la estrategia experimental de genética reversa.....	79

5.3.1.	Amplificación de los genes <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> y <i>adhE</i> de <i>S. typhimurium</i> por PCR.....	81
5.3.2.	Secuenciación de la región 5' de los genes <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> Ty2 y <i>adhE</i> de <i>S. typhimurium</i> LT2.....	81
5.3.3.	Análisis de las secuencias nucleotídicas mediante el programa BlastN en NIH-NCBI y Sanger Centre.....	85
5.3.4.	Mutagénesis del gen <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> Ty2 por inserción del vector suicida pNM2.....	96
5.4.	Caracterización de las cepas mutantes <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	98
5.4.1.	Curva de crecimiento de la mutante <i>S. typhi</i> TYT2006 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico.....	99
5.4.2.	Curva de crecimiento de la cepa mutante <i>S. typhimurium</i> NPM1 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico.....	99
5.4.3.	Comparación de las propiedades físicas y bioquímicas de las mutantes de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i> obtenidas.....	102
5.4.4.	Composición de la ME de la mutante TYT2006 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....	104
5.4.5.	Composición de la ME de la mutante <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	106
5.4.6.	Análisis del LPS de la cepa mutante <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	108
5.4.7.	Construcción de la cepa <i>S. typhi eutE</i> , mutante en una proteína similar a la alcohol deshidrogenasa AdhE de <i>E. coli</i>	108
5.5.	Análisis Southern blot de <i>S. typhi</i> Ty2 y <i>S. typhimurium</i> silvestres.....	110
5.5.1.	Análisis Southern blot de las mutantes <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	112
5.6.	Evaluación del fenotipo invasor y de proliferación de las mutantes <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	117
5.7.	Ensayos de virulencia <i>in vivo</i>	119

5.8.	Determinación de la actividad de alcohol deshidrogenasa de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i>	120
5.9.	Caracterización de la colección de mutantes de <i>S. typhi zxx::TnphoA</i> , potenciales mutantes en proteínas de membrana.....	123
5.9.1.	Medición de la actividad de fosfatasa alcalina y determinación de las mutantes reguladas por anaerobiosis.....	124
5.9.2.	Ensayos de invasión de las mutantes <i>S. typhi zxx::TnphoA</i> reguladas por anaerobiosis sobre células HEp-2 en cultivo.....	127
5.9.3.	Composición de la ME de las mutantes <i>S. typhi zxx::TnphoA</i> reguladas por anaerobiosis.....	129
5.10.	Caracterización del suero policlonal anti AipI mediante análisis Western blot de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i>	131
5.11.	Análisis de las proteínas de superficie de <i>S. typhi</i> Ty2 mediante inmunofluorescencia indirecta.....	133
6.	DISCUSION.....	136
7.	CONCLUSIONES.....	159
8.	BIBLIOGRAFIA.....	160

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas y bacteriófagos.....	21
Tabla 2.	Protocolo de transducción con MudP22.....	38
Tabla 3.	Secuencias N-terminales de las proteínas de <i>S. typhi</i> Ty2 inducidas en anaerobiosis y sus similitudes según el programa Basic BlastP.....	77
Tabla 4.	Análisis de las cepas <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i> silvestres y mutantes mediante una batería bioquímica clásica.....	103
Tabla 5.	Ensayos de invasión y proliferación de las mutantes de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i> sobre células HEp-2 en cultivo.....	118
Tabla 6.	Determinación de la expresión de alcohol deshidrogenasa mediante ensayo de sensibilidad al sustrato suicida alilalcohol (CH=CHCH ₂ OH).....	121
Tabla 7.	Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina de las mutantes <i>S. typhi</i> <i>zxx::Tnp_{phoA}</i> cultivadas en aerobiosis y anaerobiosis.....	125
Tabla 8.	Ensayo de invasión de las mutantes <i>S. typhi</i> <i>zxx::Tnp_{phoA}</i> reguladas por anaerobiosis sobre células HEp-2 en cultivo.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del compuesto NHS-Biotina.....	32
Figura 2.	Estructura del transposón <i>TnphoA</i>	39
Figura 3.	Estrategia de mutagénesis de <i>S. typhi</i> Ty2 por inserción al azar del transposón <i>TnphoA</i>	40
Figura 4.	Esquema de clonamiento de los productos de amplificación obtenidos por PCR en el vector pBluescript y pGP704.....	47
Figura 5.	Análisis de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 crecidas en aerobiosis y anaerobiosis	67
Figura 6.	Análisis de las fracciones subcelulares de <i>S. typhi</i> Ty2 crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico.....	69
Figura 7.	Proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 y densitometría.....	71
Figura 8.	Proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 marcadas con NHS-biotina.....	73
Figura 9.	Electroforesis bidimensional de las proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutante <i>S. typhi</i> TYT2006.....	75
Figura 10.	Productos de amplificación obtenidos por PCR usando DNAs cromosomales de <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> como templado.....	82
Figura 11.	Secuencia nucleotídica del fragmento 5' del gen <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> Ty2.....	84
Figura 12.	Análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento génico <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> mediante el programa BlastN en Sanger Centre.....	86
Figura 13.	Secuencia nucleotídica putativa del gen <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> Ty2.....	87
Figura 14.	Secuencia aminoacídica de la proteína AipI de <i>S. typhi</i> Ty2.....	88
Figura 15.	Alineamiento de los genes <i>aipI</i> de <i>S. typhi</i> y <i>adhE</i> de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	90
Figura 16.	Alineamiento de las proteínas AipI de <i>S. typhi</i> y AdhE de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	94

Figura 17.	Estrategia de mutagénesis de <i>S. typhi</i> Ty2 y <i>S. typhimurium</i> 14028s con el vector suicida pNM2.....	97
Figura 18.	Curva de crecimiento de <i>S. typhi</i> y mutante TYT2006 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico.....	100
Figura 19.	Curva de crecimiento de <i>S. typhimurium</i> 14028s y mutante NPM1 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico.....	101
Figura 20.	Proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutante <i>S. typhi</i> TYT2006.....	105
Figura 21.	Proteínas de la ME de <i>S. typhimurium</i> 14028s y mutante NPM1.....	107
Figura 22.	Composición del LPS de <i>S. typhi</i> y <i>S. typhimurium</i> silvestres y mutantes TYT2006 y NPM1.....	109
Figura 23.	Análisis de Southern blot de los DNAs cromosomales de las cepas <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> silvestres.....	111
Figura 24.	Experimentos de hibridación Southern de los DNAs cromosomales de las cepas mutantes <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	113
Figura 25.	Esquema de los resultados de los experimentos de hibridación de los cromosomas de las cepas mutantes <i>S. typhi</i> TYT2006 y <i>S. typhimurium</i> NPM1.....	114
Figura 26.	Análisis Southern blot del DNA-cromosomal de la mutante <i>S. typhi</i> TYT2006.....	115
Figura 27.	Proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> ::Tn <i>phoA</i> cultivadas en aerobiosis y anaerobiosis.....	130
Figura 28.	Western blot de proteínas de la ME de <i>S. typhi</i> Ty2 y mutante TYT2006.....	132
Figura 29.	Microscopía de inmunofluorescencia indirecta de bacterias vivas.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

A	: Absorbancia
Amp^R	: Resistencia a ampicilina
bla	: Gen que codifica para resistencia a ampicilina
BSA	: Albúmina de suero bovino
Células M	: Células microfoliares (intestino delgado), similares a macrófagos
Células U937	: Línea histiocítica celular humana
CHAPS	: (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato)
CTAB	: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMEM	: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEMSF	: DMEM suplementado con suero fetal de bovino al 10%
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
HEp-2	: Línea celular epitelial humana
Kan^R	: Resistencia a kanamicina
kb	: Miles de pares de bases
kDa	: Miles de Daltons
LD₅₀	: Dosis letal 50
LPS	: Lipopolisacárido
ME	: Membrana externa
MI	: Membrana interna
moi	: Multiplicidad de infección
OD₆₀₀	: Densidad óptica a 600 nm
PBS	: Tampón fosfato salino
PMSF	: Fenilmetilsulfonil fluoruro
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SPI	: Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
TCA	: Ácido tricloroacético
Tet^R	: resistencia a tetraciclina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFC	: Unidades formadoras de colonias
UFP	: Unidades formadoras de placa
XP	: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, sustrato para fosfatasa alcalina

RESUMEN

Salmonella typhi es un patógeno exclusivo del ser humano, capaz de atravesar el epitelio intestinal y proliferar dentro del macrófago, situación en que enfrenta drásticos cambios ambientales, a los cuales debe adaptarse para sobrevivir y persistir dentro del hospedero. Una de las condiciones que encuentra *S. typhi* es la baja disponibilidad de oxígeno. Se conoce, que la anaerobiosis junto a otras señales ambientales regulan en forma coordinada la expresión de genes de virulencia. La anaerobiosis, potencia la capacidad invasiva de *S. typhi* a células epiteliales en cultivo. Sin embargo, aún no se ha identificado los genes responsables de ello. Se propone, que las proteínas de superficie de la bacteria tendrían un rol fundamental en la patogenicidad, ya que son ellas las que establecen un contacto directo con las células epiteliales. Por esta razón se estudió las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 cultivadas en aerobiosis y anaerobiosis, lo que permitió demostrar la inducción de al menos siete proteínas en anaerobiosis, de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa, respectivamente.

Esta tesis planteó la hipótesis de que las proteínas de la ME de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis participan en el proceso de invasión de células epiteliales, donde la baja disponibilidad de oxígeno gatillaría la expresión de proteínas de superficie de la bacteria, determinando un fenotipo mejor dotado para la invasión de los epitelios.

Para establecer el rol en invasión de al menos una de las proteínas inducidas en anaerobiosis, se utilizó la estrategia conocida como genética reversa. Para ello se identificó las proteínas de interés mediante secuenciación N-terminal. Las secuencias analizadas en los bancos de datos mediante el programa BlastP, indicaron similitud de la

proteína de 100 kDa, AipI, (anaerobically induced protein I) con la alcohol deshidrogenasa (AdhE) de *S. typhimurium* y *E. coli*. La de 50 kDa con la flagelina de *S. typhi*, la de 46 y 44 kDa con las porina MalL y PhoE, respectivamente, ambas de *S. typhimurium*. La de 20 kDa, no presentó similitudes en los bancos de datos, lo que sugiere la identificación de una proteína quizá específica de *S. typhi*. La proteína de 80 kDa parece tener el N-terminal bloqueado y la de 36 kDa, correspondió a OmpC, previamente identificada en la literatura.

En base a la secuencia reportada para el gen *adhE* de *S. typhimurium* en GenBank, se diseñó partidores para amplificar por PCR la región 5' del gen *aipI*. El producto de 500 pb fue secuenciado y analizado mediante BlastN en los bancos de datos de NCBI y Sanger Centre, lo que permitió confirmar la similitud de *aipI* con *adhE* y ubicar el ORF completo del gen *aipI* dentro del contig 352 de Sanger Centre. El fragmento *aipI* se clonó en el vector suicida pGP704 (pNM2), utilizado entonces para transformar la cepa receptora, donde éste puede insertarse en el alelo cromosomal silvestre. Construidas las mutantes *S. typhi*::pNM2 *aipI* (TYT2006) y la *S. typhimurium*::pNM2 *adhE* (NPM1), éstas se analizaron mediante Southern blot, comprobándose la inserción de pNM2 en el gen blanco. Enseguida fueron caracterizadas genéticamente y en cuanto a sus propiedades físicas y bioquímicas. Ninguna de las mutantes presentó defectos importantes de crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis, tampoco deficiencias metabólicas, motilidad disminuída o alteraciones del LPS. El análisis de las proteínas de la ME, demostró la ausencia de AipI en la mutante TYT2006 crecida en anaerobiosis. Más aún, se observó un efecto pleiotrópico de la mutación de *aipI*, reflejado por la aparición de una banda de alrededor de 150 kDa y por una OmpC

disminuída en anaerobiosis. Incluso OmpF no se detecta en aerobiosis. Tal evidencia sugiere un rol estructural o regulatorio de AipI en la ME de *S. typhi*. En cuanto al fenotipo invasor de TYT2006 ensayado en células HEP-2 en cultivo, se demostró una drástica disminución de su capacidad invasiva, mostrando un índice de invasión de 4 % del de la cepa Ty2 silvestre (100 %). Por el contrario, la mutante NPM1 no presentó un fenotipo invasor disminuído, ni tampoco evidenció cambios en las proteínas de la ME. Más aún, en ensayos de virulencia *in vivo*, no resultó atenuada en el ratón.

AipI de *S. typhi* parece no tener la misma función que la AdhE de *S. typhimurium*, ya que la mutación del gen *adhE* no afecta el fenotipo invasor ni la composición de las proteínas de la ME de la bacteria.

Como estrategia alternativa para la obtención de mutantes de *S. typhi* que afecten proteínas de la ME, se utilizó el transposón *TnphoA*. De las 4000 mutantes obtenidas, siete mostraron graves defectos en la invasión de células HEP-2 en cultivo. Una de ellas, la mutante TYT1979, resultó deficiente en una proteína de la ME.

En conclusión, la ausencia de algunas proteínas de la superficie de *S. typhi*, reguladas por anaerobiosis, disminuye su capacidad para invadir células epiteliales de origen humano en cultivo.

SUMMARY

Salmonella typhi is a pathogen, exclusive to humans, that is able to invade the intestinal epithelial barrier and to proliferate inside macrophages. During this invasion it encounters drastic environmental changes to which it has to adapt in order to survive and persist inside the host. One of the conditions encountered is low oxygen availability. It is known, that anaerobiosis, together with other environmental signals, regulate the expression of virulence genes in a coordinated way. Anaerobiosis potentiates the capacity of *S. typhi* to invade cultured epithelial cells. However, the responsible genes are still unidentified. It is proposed, that bacterial surface proteins may play a fundamental role in pathogenicity, because they establish direct contact with the epithelial cells. For that reason, a comparison was made of the outer membrane proteins of *S. typhi* grown under aerobic and anaerobic conditions. The induction of at least seven proteins in anaerobiosis, of 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 and 20 kDa, respectively, was observed.

This work investigates the hypothesis that the anaerobically induced outer membrane proteins from *S. typhi* are involved in the epithelial cell invasion process, where low oxygen availability may trigger the bacterial surface protein expression. This may promote the invasion of epithelia cells.

In order to establish the role in invasion of at least one of the anaerobically induced proteins, we used a reverse genetic approach. Proteins of interest were identified by N-terminal sequencing and BlastP searches of data banks. Sequence comparison revealed significant similarity between the 100 kDa protein, AipI (anaerobically induce

protein I), and alcohol dehydrogenase (AdhE) of *S. typhimurium* and *E. coli*, the 50 kDa protein with *S. typhi* flagellin, the 46 and 44 kDa protein with MalL and PhoE porins respectively, both of *S. typhimurium*. No similarities could be found in data bases, with the 20 kDa protein, suggesting that this protein could perhaps be specific to *S. typhi*. Of the two remaining proteins, the 80 kDa protein, may have a blocked N-terminal and the 36 kDa, corresponded to OmpC, previously identified in the literature.

Based on the *S. typhimurium adhE* gene sequence reported in GenBank, primers were designed for the PCR amplification of the 5' region of the *aipI* gene. The 500 bp product was sequenced and analyzed by BlastN in NCBI and Sanger Centre data bases, confirming the similarity between *aipI* with *adhE* and permitted the identification of the putative complete ORF of *aipI* within contig 352 (Sanger Centre). The *aipI* fragment was cloned in a suicide vector pGP704 (pNM2) that was subsequently used to transform receptor strains, where it integrated into the corresponding wild type chromosomal gene. Two such mutants termed *S. typhi*::pNM2 *aipI* (TYT2006) and *S. typhimurium*::pNM2 *adhE*, (NPM1), were analyzed by Southern hybridization, corroborating the insertion of pNM2 in the target gene. The mutants were then genetically characterized and certain aspects of their biochemistry was studied. Neither mutant showed significant defect in aerobic or anaerobic growth, nor did they showed metabolic differences, diminished motility or LPS alterations. An analysis of the outer membrane proteins, demonstrated that AipI was absent in the anaerobically grown mutant TYT2006. Correlated, with the *aipI* mutation was the appearance of a 150 kDa band in anaerobiosis and by a decrease in OmpC, suggesting a pleiotropic effect of the

aipI mutation. Even in aerobiosis OmpF was not detected. Such evidence suggests a structural or regulatory role of AipI in the *S. typhi* outer membrane.

The ability of *S. typhi*::pNM2 to invade HEp-2 cultured cells was assayed. An invasion index of 4 % of the wild type Ty2 strain (100 %) was observed. In contrast, a *S. typhimurium*::pNM2 (NPM1) mutant did not show significant outer membrane protein changes. Moreover, alteration was not observed in mice subjected to an *in vivo* virulence assays.

AipI of *S. typhi* do not appear to have the same function of AdhE of *S. typhimurium*, because the mutation of *adhE* gene did not affect the invasion phenotype, nor the outer membrane proteins composition.

As an alternative strategy to obtain *S. typhi* mutants affected in outer membrane proteins, the *TnphoA* transposon was used to mutagenized *S. typhi* Ty2. Of the 4000 mutants obtained, seven showed significantly reduced capacity to invade cultured HEp-2 cells. One of them, mutant TYT1979, was missing an outer membrane protein.

In conclusion, the absense of some *S. typhi* surface proteins regulated by anaerobiosis affect its ability to invade cultured epitheilal cells of human origen.

1. INTRODUCCION

Entre las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Salmonella* constituye un grupo de más de 2200 serovares distintos, siendo los principales agentes etiológicos de una variedad de enfermedades, tanto en el hombre como en animales. Ocasionalmente patologías como la gastroenteritis autolimitada, la bacteremia y la fiebre entérica (tifoidea y paratifoidea). Algunas especies, como *S. enteritidis*, infecta a un gran número de aves y mamíferos, incluido el ser humano. Otras especies, por el contrario, se encuentran adaptadas a un hospedero específico, como es el caso de *Salmonella typhi* (Jones, 1996).

S. typhi, es el agente causal de la fiebre tifoidea en el hombre, siendo éste su único hospedero conocido y reservorio natural del microorganismo, por lo que se le considera un patógeno exclusivo del hombre. *S. typhi* es considerada como una infección endémica en los países en desarrollo, debido a las deficientes condiciones sanitarias ambientales existentes en estos países. Aunque la incidencia de la fiebre tifoidea ha disminuído en Chile, constituye aún un importante problema de salud pública a nivel mundial. Se estiman en alrededor de 17 millones los casos anuales de fiebre tifoidea en el mundo (Pang, 1998), por ello se hace imprescindible implementar nuevas y mejores estrategias para el control y prevención de esta enfermedad, orientando los esfuerzos hacia el tratamiento de aguas y al desarrollo de vacunas más eficaces que las conocidas hasta hoy (Levine y col., 1989; Pang, 1998). Tal desafío implica necesariamente conocer y establecer las bases moleculares de los mecanismos de patogenicidad de *S. typhi*, lo cual permitirá abordar el problema desde perspectivas más novedosas y eficaces.

El ciclo infeccioso de *S. typhi* se inicia cuando el hombre ingiere agua o alimentos contaminados con heces humanas, pudiendo resistir los mecanismos de defensa presentes en el hospedero hasta alcanzar el íleo distal. Entonces la bacteria se adhiere e invade la barrera epitelial intestinal, penetrando a través de las células M de las placas de Peyer, así como por los enterocitos. Se genera entonces un flujo de macrófagos en la lámina propia, donde *S. typhi* es capaz de sobrevivir y proliferar, para luego alcanzar la sangre, desencadenando así la fiebre tifoidea. En algunos individuos puede asentarse en la vesícula biliar, provocando un estado de portador crónico (Finlay y Falkow, 1989; Kohbata y col., 1986).

A pesar de que el ciclo infeccioso de *S. typhi* parece bien caracterizado a nivel fisiológico, no ocurre lo mismo a nivel molecular. Sólo en los últimos años se ha comenzado a establecer los mecanismos moleculares de la invasión por *Salmonella*, describiéndose dos etapas clave para el ciclo infeccioso. Una es la invasión del epitelio intestinal y la segunda, la sobrevivencia y proliferación dentro del macrófago, lo que le permite diseminarse y persistir en el sistema reticuloendotelial de su hospedero (Jones, 1996). Debido a que *S. typhi* es un patógeno muy adaptado al ser humano, el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad ha resultado difícil, ya que no existe un animal, modelo de laboratorio, que permita reproducir experimentalmente la enfermedad. Es por esto que algunos investigadores han estado estableciendo analogías entre la fiebre tifoidea del hombre, causada por *S. typhi* y una enfermedad similar producida por *S. typhimurium* en el ratón. No obstante, ambas especies de *Salmonella* producen enfermedades muy diferentes en el ser humano (Bäumler, 1997; Selander y col., 1991). Además, ha quedado demostrado que aunque existen obvias semejanzas

entre las dos enfermedades, las diferencias entre ellas limitan las proyecciones que se puedan hacer desde el ratón-*S.typhimurium* al hombre-*S. typhi*. Por ejemplo, mutantes *galE* de *S. typhimurium* son de virulencia muy reducida en ratones y terneros (Clarke y Gyles, 1986). En cambio, mutantes *galE viaB* de *S. typhi* Ty2 retienen virulencia en humanos (Hone y col., 1988). Estudios a nivel evolutivo, entre los serotipos de *Salmonella*, sugieren que el linaje filogenético de *S. typhi* es muy antiguo y que la adaptación al ser humano sería un acontecimiento reciente mediado por la adquisición horizontal de genes (Pang, 1998; Selander y col., 1991). Una de las diferencias potencialmente importantes entre *S. typhi* y *S. typhimurium* es el ordenamiento de los genes cromosomales. En *S. typhi* existen inversiones y transposiciones en siete segmentos de DNA, entre los operones *rrn* y al menos tres inserciones y rearrreglos cromosomales que no han sido detectados en *S. typhimurium* (Liu y Sanderson, 1995) y que podrían tener un rol en la virulencia de *S. typhi*. Además, *S. typhi* no porta un plasmidio codificante de genes involucrados en virulencia como lo hace *S. typhimurium* (Galán, 1996). Por otro lado, se ha demostrado, que el lipopolisacárido (LPS) es esencial para que *S. typhi* pueda invadir células HeLa (Mroczenski-Wildey y col., 1989). En cambio, en *S. typhimurium* no se requeriría de un LPS intacto para este proceso (Giannella y col., 1973), aunque se le ha definido como un importante factor de virulencia en el ratón. El rol del flagelo también varía entre ambas especies. La motilidad afecta el fenotipo invasor de *S. typhi*, no así el de *S. typhimurium* (Liu y col., 1988). Por otro lado, la utilización de líneas celulares en ensayos de virulencia *in vitro*, ha apuntado en reiteradas ocasiones la existencia de una relación directa entre la virulencia de la bacteria *in vivo* y su capacidad de invadir células epiteliales y sobrevivir

dentro de macrófagos en cultivo (Arricau y col., 1998; Hong y Miller, 1998). Por lo tanto, se debe ser muy cauteloso a el momento de interpretar los resultados obtenidos acerca de los mecanismos de patogenicidad de *S. typhi*, a partir de cualquier otro modelo que no sea el natural.

Los mecanismos por los cuales un patógeno invade son en la actualidad motivo de gran interés. Estrategias genéticas y el empleo de cultivos continuos de células de origen animal, han facilitado enormemente la comprensión de la bioquímica y biología celular del proceso de invasión. La adherencia y penetración a las células epiteliales de la mucosa intestinal son las primeras etapas en el establecimiento de la infección por *Salmonella* y también por otros patógenos entéricos.

Se ha comprobado, que las proteínas de la ME son indispensables para la invasión de los epitelios y para la resistencia dentro del macrófago, de manera que mutantes en estas proteínas de ME resultan atenuadas en su virulencia. Esto ha sido bien estudiado en *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* enteropatogénica y diversas especies de *Salmonella* (Isberg y col., 1987; Michiels y col., 1990; Hermant y col., 1995; Galán, 1996), donde se ha demostrado que las estructuras de la superficie bacteriana son fundamentales, ya que ellas están expuestas al exterior, estableciendo el contacto con los epitelios, células específicas y elementos humorales de las defensas del hospedero (Peterson y Quie, 1981).

El patógeno mejor estudiado es *Yersinia pseudotuberculosis*, en el cual una proteína de la ME denominada invasina, es capaz de mediar la internalización de la bacteria a células epiteliales (Isberg y col., 1987). En el caso de *Y. enterocolitica*, se identificó un locus adicional al *inv*, denominado *ail*, que también codifica una proteína de ME,

principal responsable de la invasividad de esta especie (Miller y Falkow, 1988). En todas las especies de *Yersinia* existen plasmidios que contribuyen a la virulencia, codificando las proteínas de secreción, denominadas Yops, que transitoriamente se localizan en la ME, participando en la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal (Cornelis y col., 1989b). Una de ellas, YopH, es una fosfatasa que aparece antagonizando el efecto inductor de la invasina (Isberg y Van Nhieu, 1994).

En estudios de virulencia con cepas patógenas de *Shigella*, se ha observado que éstas inducen su internalización en las células de la mucosa del colon. La mayoría de los genes necesarios para la virulencia de *Shigella* se encuentran en plasmidios grandes, de alrededor de 220 kb. Los genes *ipa*, codificados en ellos, son necesarios para la invasión de células HeLa y para que la bacteria pueda escapar de la vesícula endocítica en que queda encerrada cuando invade la célula hospedera (Maurelli, 1992). Dos de estos genes, *ipaB* e *ipaC* codifican proteínas que son expuestas en la superficie de la bacteria (ME) y luego secretadas al medio extracelular. La mutación de los genes *ipaB*, *ipaC* o *ipaD* reduce drásticamente la invasividad del patógeno (Hermant y col., 1995).

La adherencia e invasión del epitelio intestinal en *Salmonella* son también etapas claves en el establecimiento de la infección. Tal es el caso de *S. typhimurium*, capaz de inducir su internalización en células epiteliales no fagocíticas del ratón. El estudio de mutantes defectuosas en estos procesos, principalmente en ensayos con líneas celulares epiteliales en cultivo, ha permitido comenzar a dilucidar los mecanismos por los cuales *Salmonella* logra acceder al interior de su hospedero y sobrevivir dentro de él. El proceso de entrada de *S. typhimurium* resultó ser mucho más complejo que el de

Yersinia o *Shigella* (Galán, 1996), y en el cual también participan genes codificados en un plasmidio de virulencia.

Estudios recientes, enfocados hacia el conocimiento de las bases celulares del proceso de invasión de *Salmonella*, han permitido demostrar que *S. typhimurium* atraviesa la barrera epitelial del intestino del ratón desde la superficie apical hacia el tejido subyacente, induciendo importantes cambios morfológicos en el epitelio. La infección del hospedero se inicia a través de las células M residentes en las placas de Peyer, lo que permite la invasión de los enterocitos y la penetración a tejidos más profundos (Jones, 1996; Penheiter, 1997). *S. typhi*, analizada en el mismo modelo de segmento ligado de íleo de ratón, produjo un daño menor a las células M, sin alterar los enterocitos del epitelio (Kohbata y col., 1986). Hechos similares han sido comunicados a partir de estudios de invasión realizados en líneas celulares epiteliales en cultivo (Bliska y col., 1993; Ginnocchio y col., 1994). Al momento de contactar la célula eucariótica, tanto *S. typhi* como *S. typhimurium*, inducen el reordenamiento transitorio del citoesqueleto de la célula, debido a la polimerización de microfilamentos de actina, que conducen a movimientos ondulatorios de la membrana celular denominados "ruffling", que finalmente permiten englobar a la bacteria (Pace y col., 1993). El patógeno permanece dentro de esta vacuola e inicia la formación de Sifs (*Salmonella* induced filaments) y luego la replicación intracelular (Mills y Finlay, 1994). Tales eventos van acompañados de un aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular y una captación masiva de fluido extracelular o macropinocitosis (Pace y col., 1993; García del Portillo y Finlay, 1994).

También en la bacteria se pueden observar cambios. Cuando *S. typhimurium* contacta la célula blanco, se inicia la formación de estructuras supramoleculares en su superficie, denominadas invasomas (Ginnocchio y col., 1994) y se estimula además la secreción de proteínas específicas para la invasión, como SipABCD (Zhou y col., 1999), SopE e InvJ (Hermant y col., 1995; Zierler y Galán, 1995; Galán, 1996). Estas son secretadas por el sistema tipo III o dependiente de contacto, el cual se considera como específico para la secreción y translocación directa de ciertos factores de virulencia al citoplasma de la célula blanco (Wood y col., 1996; Lee, 1997; Collazo y Galán, 1997). Los invasomas son estructuras filamentosas transientes, que no requieren síntesis de novo y que desaparecen luego de iniciado el proceso de invasión, por lo que se les ha relacionado con este sistema de secreción-exportación, específico de proteínas dirigidas hacia el ambiente extracelular, descrito en *Salmonella* y en otra variedad de patógenos animales y de plantas, tales como *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* y *Erwinia* (Kaniga y col., 1995; Lee, 1997). No obstante, un estudio más reciente informó que este sistema tipo III (SPI I), no sería requerido para la formación de los invasomas en *S. typhimurium*, ya que mutantes en genes *invA*, *invG*, *prgH* o *sipC* aún los presentaban en su superficie (Reed y col., 1998).

Cada una de las etapas descritas, tanto desde el punto de vista de la célula eucariote como del patógeno, es esencial. De hecho, mutantes de *S. typhimurium* defectuosas en invasión fueron incapaces de inducir estos cambios en las células epiteliales (Ginnocchio y col., 1994). La célula por su parte cumple un rol activo, ya que al ser inhibida la polimerización de actina mediante citocalasinas, es posible bloquear el proceso de internalización de la bacteria (Jones, 1996).

Un gran número de loci genéticos involucrados en invasión ha sido identificado en distintos laboratorios. En una primera etapa, se identificó una región cromosomal que codificaba al menos 10 genes necesarios para la invasión de *S. typhimurium*. Entre ellos, *invA* codifica para una proteína integral de membrana interna, homóloga a otras proteínas bacterianas que actúan en la exportación de polipéptidos. Inserciones de *TnphoA* en *invA* e *invB* virtualmente eliminan la capacidad invasora de las bacteria, pero no afectan la adherencia (Ginnocchio y col., 1992). *invC* codifica para una ATPasa involucrada en el proceso de secreción (Galán y Curtis III, 1989). Más tarde, se caracterizó *invE*, cuyo producto gatilla la internalización de la bacteria en células epiteliales, homólogo a MxiC de *Shigella* y YopN de *Yersinia*, indispensables para la entrada de estas bacterias a células no fagocíticas. Mutantes *invE* se adhieren a la célula epitelial pero no inducen su internalización (Ginnocchio y col., 1992). Otro gen, *invH*, codifica para una proteína de membrana necesaria para la adherencia e invasión en varios serotipos de *Salmonella* (Altmeyer y col., 1993). El producto del gen *invJ* no posee secuencia señal de exportación y sin embargo, es excretado al medio de cultivo, mediante un sistema de secreción constituido por los productos de los genes *inv* (Lee, 1997).

En el caso de *S. typhi*, esta estrategia de clonamiento de genes de invasividad no resultó tan exitosa, ya que sólo se aisló clones de *E. coli* que invadieron células Henle 407 entre un 4 % a 7% de lo mostrado por la cepa silvestre (Elsinghorst y col., 1989). En *S. typhimurium*, una región homóloga a la encontrada en *S. typhi*, fue clonada en *E. coli*, pero no fue capaz de conferirle la capacidad de invadir células Henle 407 (Elsinghorst y col., 1989).

Estos antecedentes sugieren que la expresión del fenotipo invasor de *Salmonella* es multifactorial, ya que se requiere de varios loci cromosomales para la manifestación de una invasividad plena.

Estudios genéticos posteriores, en *S. typhimurium*, consistieron en clonar genes provenientes de una cepa virulenta, que complementaran a una cepa que no lo fuera para el ratón. De esta forma se identificó un locus distinto al descrito por Elsinghorst y col., (1989), que también se denominó *inv* (Galán y Curtiss III, 1989). Otra estrategia experimental, consistió en la obtención de mutantes no invasoras generadas por inserción al azar de transposones como Tn10, Tn*phoA* y derivados de Mu en el cromosoma de *S. typhimurium*. Las mutantes *inv* obtenidas resultaron atenuadas por la vía oral en el ratón, según la determinación de su LD₅₀, no así por la vía intraperitoneal (Galán y Curtiss III, 1991). Ello permitió demostrar, que el locus *inv* de *S. typhimurium* estaba compuesto de al menos 13 genes, también presentes en *S. typhi*.

Hasta la fecha se ha identificado un gran número de genes involucrados en el proceso de invasión de células epiteliales. Estos se encuentran agrupados en regiones discretas del cromosoma de *Salmonella*, las cuales han sido denominadas "islas de patogenicidad". Estas al parecer fueron adquiridas por transferencia horizontal, ya que presentan un contenido G+C menor que el resto del cromosoma (Hacker y col., 1997). En *S. typhimurium* ya se han descrito cinco islas de patogenicidad (SPI), las cuales están presentes en cepas virulentas, pero ausentes en cepas no virulentas (Galán, 1996; Shea y col., 1996; Blanc-Potard y Groisman, 1997; Wong y col., 1998; Wood y col., 1998). Tres de estas SPI se han descrito también en *S. typhi* (SPI I, II y III). Los alrededor de 30 genes involucrados en la invasión del epitelio intestinal se encuentran agrupados en el

centisoma 63, en una región discreta de 40 kb, específica del género *Salmonella*, denominada SPI I (Galán, 1996). En ella se encuentran codificados el sistema de secreción tipo III (*inv-spa*), las proteínas específicas de invasión (*sipABCD*; *invF*, entre otros) y las proteínas regulatorias (*hilA*) (Bajaj y col., 1996).

Por el contrario, la isla de patogenicidad II (SPI II), fue descubierta mediante un enfoque experimental diferente. Se encontró por selección negativa de mutantes *S. typhimurium* incapaces de sobrevivir en el ratón al ser administradas por vía intraperitoneal. La región afectada por las mutaciones comprendió una región de alrededor de 40 kb localizada en el centisoma 31 del cromosoma y cuyos productos génicos deducidos presentaron homología con el sistema de secreción tipo III (Shea y col., 1996).

La aplicación de los distintos enfoques experimentales descritos, ha demostrado que no sólo los genes tradicionalmente involucrados en el proceso de invasión son importantes para la virulencia de *Salmonella*, sino también algunos genes implicados en el metabolismo general o también llamados "housekeeping genes". Probablemente estos genes metabólicos pueden estar contribuyendo a la sobrevivencia y persistencia del patógeno en condiciones limitantes de nutrientes (Heithoff y col., 1997). Tales resultados vuelven a plantear la pregunta acerca de cual es la definición de factores de virulencia, que en un sentido más amplio acepta, que cualquier propiedad que le permita al patógeno entrar, crecer o sobrevivir dentro de su hospedero. Por ejemplo, antígenos de superficie que evadan al complemento, mecanismos de adhesión a la célula blanco, sistemas de adaptación a las fluctuaciones ambientales e incluso la presencia de enzimas que le permita sintetizar nutrientes ausentes en el hospedero (Slauch y col., 1997).

La interacción patógeno-hospedero, en el ciclo infectivo de un parásito intracelular facultativo, es un proceso dinámico, durante el cual la bacteria está expuesta a diversos ambientes intra- y extracelulares, los cuales son "percibidos" por el patógeno, provocando una respuesta adaptativa que le permite sobrevivir en las nuevas condiciones (Mekalanos, 1992).

En la actualidad, se dispone de evidencias claras que demuestran que la expresión de los determinantes de virulencia bacterianos están regulados por señales ambientales (Slauch y col., 1997; Bajaj y col., 1996). Por ejemplo, la expresión de muchos genes requeridos para la invasión de células epiteliales, está finamente regulada en respuesta a las condiciones que encuentra la bacteria en el interior de su hospedero, donde prima la baja disponibilidad de oxígeno, la carencia de hierro y la alta osmolaridad, entre otros (Mekalanos, 1992; Bajaj y col., 1996).

Es así como el fenotipo virulento de *Shigella* spp. es regulado a través de la temperatura, de modo que sólo las bacterias cultivadas a 37°C son invasoras, no así las crecidas a 30°C (Maurelli y Sansonetti, 1988). En este caso, la respuesta a la temperatura está regulada a nivel transcripcional por el gen cromosomal *virR*, que regula al gen *virB* plasmidial, cuyo producto es el activador transcripcional de los genes *ipa* (Maurelli y Sansonetti, 1988). Una situación semejante ocurre en especies de *Yersinia*. En ellas los genes *yop* se expresan únicamente a 37°C, siendo regulada la expresión por el activador transcripcional VirF, que además es el sensor de temperatura y de la concentración de Ca^{+2} intracelular (Cornelis y col., 1989a). En *Vibrio cholerae*, la expresión de la toxina del cólera (CT) y de los pili TCP es óptima en el rango fisiológico de osmolaridad de los tejidos del hospedero, siendo mediado el efecto por ToxR, que además responde a otras

señales como pH, temperatura y disponibilidad de ciertos aminoácidos (Miller y Mekalanos, 1988). En *S. typhimurium*, la expresión del gen *invA* es inducida en alta osmolaridad, condición que afecta el grado de enrollamiento del DNA, al igual que la temperatura (Galán y Curtiss III, 1990). También, se ha demostrado que *S. typhimurium* crecida en condiciones anaeróbicas potencia su capacidad invasora a células en cultivo respecto de la bacteria crecida en aerobiosis (Schiemann y Shope, 1991). Además, se ha aislado genes inducidos en anaerobiosis. Por ejemplo, el gen *orgA* codificado en la SPI 1, descrito tanto en *S. typhimurium* como *S. typhi*, al ser mutado disminuye drásticamente la capacidad invasiva de ambas bacterias. La proteína deducida de este gen no presenta similitud con proteínas conocidas, desconociéndose a la fecha su función y relación con el fenotipo invasor (Jones y Falkow, 1994).

La expresión de muchos, sino todos los genes requeridos para la invasión en *S. typhimurium* son regulados en respuesta al medioambiente (Mekalanos, 1992), de modo que la invasión es inducida sólo en alta osmolaridad, pH alcalino y baja disponibilidad de oxígeno, siendo por el contrario, reprimida por el sistema regulador de dos componentes PhoP/Q, asociado a la capacidad de sobrevivir y proliferar dentro del macrófago (Pegues y col., 1995; Slauch y col., 1997). Todas estas condiciones deben ocurrir en forma simultánea para obtener una expresión génica significativa. Los genes esenciales para la invasión de *S. typhimurium* son regulados en forma coordinada a través de la acción del activador transcripcional HilA y SirA (Bajaj y col., 1996; Johnston y col., 1996). *hilA* (Lee y col., 1992) se encuentra codificado en la SPI 1 y pertenece a la familia de activadores transcripcionales OmpR/ToxR (Bajaj y col., 1995).

El sistema *phoP/phoQ*, descrito en *S. typhimurium* y *S. typhi* (Pegues y col., 1995; Baker y col., 1997), regula la expresión de los genes *pag* (activados por PhoP) y los genes *prg* (reprimidos por PhoP), involucrados en la capacidad de sobrevivir dentro del macrófago (Miller y col., 1991), así como también en la coordinación de la regulación del fenotipo invasor en células epiteliales a través de los genes *prgH* y *hilA* (Bajaj y col., 1996; Baker y col., 1999). Notablemente, el producto del gen *pagC* ha sido caracterizado como una proteína de ME esencial para la sobrevivencia dentro del macrófago (Pulkkinen y Miller, 1991). PagC posee homología con otras proteínas de la ME previamente caracterizadas, como Ail de *Y. enterocolitica* y OmpX de *E. cloacae* (Pulkkinen y Miller, 1991). Sin embargo, aún se desconoce cómo la presencia de PagC en la superficie bacteriana logra el efecto protector. Resultados análogos han sido obtenidos en nuestro laboratorio para la porina OmpC de *S. typhi*, donde su mutagenización afectó el índice de proliferación intracelular de *S. typhi* en células HEp-2 en cultivo, no así su capacidad invasora (Contreras, 1994).

En el caso de *S. typhi*, la mayoría de los genes de invasión y virulencia que se han identificado hasta hoy son homólogos a los reportados para *S. typhimurium*. Así ocurrió en un estudio reciente, donde se caracterizó un grupo de 16 mutantes de *S. typhi* afectadas en invasión, obtenidas por inserción al azar del transposón *TnphoA*, reportándose en la mayoría de ellas mutaciones en los genes *invG* y *prgH*, homólogos a los de *S. typhimurium* (Leclerc y col., 1998). El análisis de la expresión de las fusiones génicas en respuesta a varios estímulos ambientales, demostró que *invG* y *prgH* se inducen en alta osmolaridad, fase de crecimiento logarítmica y baja disponibilidad de oxígeno. Además, *invG* resultó regulado por el nivel de enrollamiento del DNA. Tales

resultados, hacen suponer que aun existen algunos genes no descubiertos, dado que ambas especies causan distintos tipo de enfermedad en el humano.

La virulencia de *S. typhi* parece estar relacionada también con la presencia del antígeno capsular Vi. En aquellas cepas que se expresa el antígeno Vi, la secreción de las proteínas Sip y flagelina está impedida (Arricau y col., 1998). El sistema regulador de dos componentes, RcsB/RcsC, modula en forma diferencial la expresión de Sip, flagelina y Vi en respuesta a los cambios de osmolaridad en el medio. En condiciones de baja osmolaridad, la transcripción de los genes *iagA*, *invF* y *sipB* es negativamente controlada por el regulador RcsB, siendo la producción de Vi máxima. A medida que la osmolaridad en el medio aumenta, la transcripción de estos genes se va incrementando y la síntesis del polisacárido Vi va disminuyendo. El producto del gen *iagA*, por su parte, se involucra en la transcripción de los genes *invF* y *sipB*, la cual ocurre en forma selectiva durante la fase de crecimiento exponencial y en 0.3M de NaCl. Como es de esperar y dado el rol esencial de la proteínas Sip y la motilidad en la entrada de *S. typhi* a las células epiteliales, se concluye que RcsB y osmolaridad modulan la capacidad invasora de *S. typhi*. Lo que en este caso confirmaría la respuesta adaptativa del patógeno a las distintas condiciones ambientales que encuentra durante su ciclo infectivo.

En nuestro laboratorio hemos estado interesados en el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad de *S. typhi*, particularmente en los eventos tempranos de la infección, que incluyen la interacción de la bacteria con las células epiteliales del lumen intestinal y la capacidad de sobrevivir y proliferar en los macrófagos humanos.

Una de las condiciones que encuentra *S. typhi* dentro de su hospedero, tanto en el intestino como en los tejidos, es la baja disponibilidad de oxígeno. En la literatura se encuentran antecedentes que demuestran que en *E. coli* y *S. typhimurium* existe regulación génica en función de la disponibilidad de oxígeno (Spiro y Guest, 1991; Ernst y col., 1990). Cuando las bacterias son crecidas en anaerobiosis, numerosos genes involucrados en la respiración aeróbica son reprimidos, en tanto que otros genes de las vías fermentativas o de la respiración anaeróbica son inducidos (Strauch y col., 1985; Spiro y Guest, 1991). También se han descrito sistemas reguladores globales en *E. coli*, como el sistema ArcB/ArcA y el factor transcripcional Fnr (OxrA en *S. typhimurium*), que responden a la ausencia de oxígeno regulan la expresión de enzimas metabólicas. No obstante, el mecanismo por el cual ellos detectan los cambios en los niveles de oxígeno aun se desconocen (Gennis y Stewart, 1996).

Se ha demostrado que el cultivo previo de las bacterias en condiciones anaeróbicas potencia la capacidad invasora de *S. typhi* y *S. choleraesuis* a células MDCK (Lee y Falkow, 1990). Resultados similares se obtuvieron para *S. typhimurium* sobre células HEp-2 y Henle (Ernst y col., 1990). En tanto, en nuestro laboratorio se demostró, que *S. typhi* cultivada en condiciones anaeróbicas invade y prolifera mejor en células HEp-2 y U937, que las bacterias crecidas en aerobiosis (Contreras, 1994). Con el fin de identificar los genes responsables de la potenciación de este fenotipo invasor y en base a los antecedentes recopilados en la literatura acerca de la participación de las proteínas de la superficie de las bacterias en la adhesión e invasión de células epiteliales, se propuso examinar las proteínas de la ME de *S. typhi* crecidas en aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente. El análisis en geles SDS-PAGE mostró la inducción de al

menos siete proteínas por la condición ambiental anaeróbica, mientras que otras resultaron reprimidas (Contreras y col., 1997).

2. HIPOTESIS

Algunas de las proteínas de la ME de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis participan en el proceso de invasión (entrada) a células epiteliales HEp-2 en cultivo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Este trabajo de tesis propone establecer el rol, de al menos una de las proteínas de la ME de *S. typhi* inducida en anaerobiosis, en el proceso de invasión (entrada) de células epiteliales de origen humano (HEp-2) en cultivo. Para ello se generará *S. typhi* mutantes en estas proteínas de la ME, mediante la estrategia conocida como genética reversa. En paralelo, se utilizará métodos clásicos, como la mutagénesis con el transposón *TnphoA*. Esta aproximación experimental nos permitirá inferir el papel de dicha proteína en el proceso de invasión del epitelio intestinal de su hospedero natural, el ser humano.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Aislamiento de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 inducidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. Análisis en electroforesis uni y bidimensional.

- a) Obtención de las fracciones de membrana externa e interna de *S. typhi* crecida en aerobiosis/anaerobiosis por tres métodos diferentes, con el objeto de comparar los perfiles de proteína obtenidos en geles unidimensionales y elección del método más apropiado para continuar este estudio.
- b) Análisis de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecida en aerobiosis y anaerobiosis mediante geles bidimensionales.

3.2.2. Selección e identificación de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 mayormente inducidas en anaerobiosis.

- a) Cuantificación de las proteínas de la ME (método del BCA de Pierce), análisis densitométrico de los perfiles electroforéticos obtenidos en geles unidimensionales y determinación de las proteínas mayormente inducidas.
- b) Identificación de las proteínas inducidas en anaerobiosis mediante secuenciación N-terminal y análisis las secuencias aminoacídicas obtenidas en los bancos de datos disponibles mediante BlastP.

3.2.3. Construcción de la mutante *S. typhi* afectada en la proteína de la ME de interés, mediante genética reversa.

- a) A partir de la secuencia de aminoácidos N-terminal obtenida para la proteína de interés, determinar el gen codificante, según las similitudes que presente en los bancos de datos disponibles.
- b) Amplificación por PCR del gen de interés tomando como templado el DNA cromosomal de *S. typhi* Ty2 y clonamiento del producto de amplificación en el vector suicida pGP704.
- c) Mutagénesis de *S. typhi* Ty2 mediante inserción del vector suicida derivado del pGP704 en el gen cromosomal silvestre.

3.2.4. Construcción de una *S. typhimurium* patógena con una mutación homóloga a la de *S. typhi*, para determinar el efecto de dicha mutación en ensayos de virulencia *in vivo*.

3.2.5. Evaluación del fenotipo invasor de las mutantes generadas por genética reversa, sobre células epiteliales HEp-2 en cultivo.

3.2.6. Obtención de una colección de *S. typhi* mutantes mediante inserción del transposón *TnphoA*.

- a) Aislamiento de una colección de fusiones génicas mediante inserción del transposón *TnphoA*.

- b) Selección de las fusiones génicas reguladas por anaerobiosis, evaluación del fenotipo invasor y análisis de las proteínas de la ME.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se encuentran ordenadas en la Tabla 1, habiendo sido algunas de ellas gentilmente cedidas por los Drs. L. Bossi (Laboratorio de Genética Molecular, CNRS; Gif sur Yvette, Francia), S. Maloy (Universidad de Illinois, USA), P. Youderian (Universidad de Idaho, USA), F. Heffron (Universidad de Utrech, Holanda) y J. Slauch (Universidad de Illinois, USA). Las cepas restantes forman parte del cepario del Dr. Guido Mora o han sido construídas para este estudio, siendo derivadas de *S. typhi* Ty2 silvestre, *S. typhimurium* LT2 silvestre, *S. typhimurium* 14028s patogénica o de *E. coli*. Algunas mutantes de *S. typhi* fueron construídas por inserción del transposón *TnphoA* usando el profago MudP22 (Maloy, 1990), mediante transducción desde cepas *S. typhimurium* mutantes usando P22 (Maloy, 1990) y por inserción cromosomal del vector suicida pNM2 (Miller y Mekalanos, 1988). Las cepas mutantes de *S. typhimurium* se construyeron por transducción con P22 o por inserción cromosomal del vector suicida pNM2. Las cepas de *E. coli* se electrotransformaron con los vectores pBluescript KS II (Stratagene), pMA12, pMA21, pGP704 (Dr. J. Slauch) o pNM2.

TABLA 1. Cepas bacterianas y bacteriófagos.

Cepa o bacteriófago	Descripción fenotipo/genotipo	Fuente/referencia
<i>Salmonella typhimurium</i>		
MA1053	14028s, silvestre, patogénica	L. Bossi
LT2	Silvestre, avirulenta	OMS
MS1	14028r <i>ims50::Tn10 Tet^r</i>	F. Heffron
NPM3	LT2 <i>ims50::Tn10 Tet^r</i>	Este estudio
NPM1 yNPM2	14028s:: <i>pNM2 Amp^r</i>	Este estudio
MST2001	<i>hisC10091::TnphoA his (H o A) 9556</i> :: <i>MudP22/pP22 cola Amp^r</i> , alias TT15088	S. Maloy
MST2002	<i>hisG10085::TnphoA his (H o A) 9556</i> :: <i>MudP22/pP22 cola Amp^r</i> , alias TT15089	S. Maloy
<i>Salmonella typhi</i>		
Ty2	Silvestre <i>Trp⁻ Cys⁻</i>	G. Mora
TYT2010 y 2011	Ty2 <i>ims50::Tn10 Tet^r</i>	Este estudio
TYT2006	Ty2:: <i>pNM2 Amp^r</i>	Este estudio
TYT2007	Ty2:: <i>pNM2 Amp^r Backcross</i>	Este estudio
TYT1952 a 1985	Ty2 <i>phoN zxx::TnphoA Kan^r XP^r</i>	Este estudio
TYT1415	Ty2 <i>phoN::Tn10 Tet^r</i>	S. Maloy
TYT1482	Ty2 <i>phoN Tet^r</i>	S. Maloy
<i>Escherichia coli</i>		
EM593	alias JM109	S. Maloy
EM1524	EM593/ <i>pMA12 Amp^r, XG⁻</i>	Este estudio
EM1525	EM593/ <i>pMA21 Amp^r, XG⁻</i>	Este estudio
EM1526	EM593/ <i>pBluescript KS Amp^r, XG⁺</i>	Este estudio
NM1	DH5α (<i>λpir</i>)/ <i>pNM2 Amp^r</i>	Este estudio
<i>λpir</i>	DH5α <i>recA(RP4-2-Tc::Mu)λpir</i>	P. Youderian
EM1248	alias SM10 <i>λpir recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r</i> / <i>pGP704 Amp^r</i>	J. Slauch
Bacteriófagos		
P22 HT <i>int</i>	Fago transductor	S. Maloy
P22 H5	Fago lítico <i>c2</i>	S. Maloy

4.1.2. Plasmidios

pGP704: Vector suicida diseñado para construir mutantes por inserción. Contiene un fragmento *Bam*HI derivado de pBR322 que incluye el gen *bla* (Amp^r), el origen de replicación R6K, dependiente de la proteína Pir para su funcionamiento, una región *mob* de pRP4 y un sitio múltiple de clonamiento (Miller y Mekalanos, 1988).

pNM2: Derivado del vector suicida pGP704. Tiene clonado entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI un fragmento de 500 pb correspondiente a la región 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2. Diseñado para mutar por inserción del vector pNM2 el alelo silvestre del gen *aipI* en el cromosoma de *S. typhi* Ty2 (este estudio).

pBluescript II KS (+/-): Vector comercial de Stratagene. Utilizado para secuenciar fragmentos de DNA clonados en el sitio múltiple de clonamiento (MCS).

pMA12: Derivado del pBluescript II KS (+/-). Tiene clonado entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI un fragmento de 500 pb correspondiente a la región 5' del gen *adhE* de *S. typhimurium* 14028s (este estudio).

pMA21: Derivado del pBluescript II KS (+/-). Tiene clonado entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI un fragmento de 500 pb correspondiente a la región 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2 (este estudio).

4.1.3. Bacteriófagos

P22 HT105/1 *int*-201: Fago transductor generalizado para *Salmonella*, P22 HT*int*, derivado de P22 que corresponde a un mutante de alta frecuencia de transducción.

MudP22: Fago híbrido que contiene los extremos derecho e izquierdo de Mu reconocidos por las transposasas, que flanquean el material genético del fago P22 defectuoso en el proceso de integración y escisión.

P22 H5: Fago lítico para *S. typhimurium*, derivado del fago P22, mutante en el represor *c2*.

4.2. Condiciones de cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron rutinariamente en caldo Luria Bertani (LB) como medio enriquecido [triptona 10 g/L (Difco); extracto de levadura 5 g/L (Difco); NaCl 5 g/L (Fluka)] o medio E como medio mínimo [$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L, ácido cítrico $\times 1\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 13,1g/L; $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 3,3 g/L] suplementado con glucosa 2 g/L (Sigma), como única fuente de carbono, incluyendo los aminoácidos cisteína 50 mg/ml y triptófano 50 mg/ml (Sigma), cuando fue necesario (auxotrofia *S. typhi*). Los medios de cultivo sólido se prepararon agregando 15 g/L de agar agar (Difco). Los antibióticos usados fueron: kanamicina (Kan) 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma),

tetraciclina (Tet) 10 µg/ml (Sigma), y ampicilina (Amp) 50 µg/ml o 30 µg/ml (Gibco). El ambiente anaeróbico se obtuvo con sobres generadores de hidrógeno y anhídrido carbónico (Difco). El sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, Sigma) se agregó a las placas a una concentración final de 30 µg/ml y el sustrato cromogénico X-P (5-bromo-4-cloro-indolilfosfato, Sigma) a 35 µg/ml.

Las cepas bacterianas se cultivaron en general a 37°C, en condiciones aeróbicas en matraces de 125 ml con agitación vigorosa (200 rpm) y en condiciones anaeróbicas en tubos Spectronic dentro de jarras GasPack o con una cubierta de aceite mineral (Sigma) sin agitación. Los cultivos frescos se obtuvieron inoculando 25 ml de medio LB con 50 µl de un cultivo bacteriano saturado (crecido toda la noche) e incubando hasta fase exponencial temprana (densidad óptica entre 0,2 y 0,25 unidades de absorbancia a 600 nm).

4.3. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular epitelial HEP-2 (ATCC; CCL-23), derivada de carcinoma de laringe humano, comprada al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Las células se cultivaron en botellas T25 o T75 (Nunc) con 5 ml o 12 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (BiosChile) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (DMEMSF) (Gibco), glutamina (2 mM; Gibco) y una combinación de antibióticos-antimicótico (penicilina-estreptomina-fungizona; Gibco), a 37°C en una atmósfera de 10 % CO₂ y 90 % aire 90. El medio de cultivo de cada botella se cambió por medio fresco cada 3 días. Para remover las células HEP-2 se lavó la monocapa

celular dos veces con tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS: NaCl 27,4 mM; KCl 0,54 mM; Na₂HPO₄ 1,46 mM; KH₂PO₄ 0,29 mM), luego se agregó 1 ml de solución de tripsina 0,5 g/L - EDTA 0,2 g/L (Gibco), se incubó en esta solución por 5 min a 37°C y luego se golpeó suavemente el fondo de la botella para desprender las células. Entonces se agregó 1 ml de DMEMSF para inactivar la tripsina, se contaron las células usando una cámara de Neubauer y se les resuspendió en el volumen adecuado de DMEMSF para continuar la propagación en las condiciones ya descritas o para sembrar sobre placas de cultivo de celular de 96 pocillos (Nunc) sin antibiótico. En este caso, se sembró alrededor de 5×10^4 células (100 μ l) por pocillo, para obtener una monocapa con 90 % de confluencia luego de 18 h de cultivo, la cual se utilizó para realizar los ensayos de invasión correspondientes. Las HEp-2 se guardaron en tanques con nitrógeno líquido, pasando por una etapa previa de enfriamiento gradual en freezer de -80°C. Para ello, se cosecharon las células (10^6 células/ml) por centrifugación por 15 min a 1000 x g y se resuspendieron en 1 ml de medio DMSO 10 %, SBF 90 % en un vial criogénico (Nunc).

4.4. Caracterización de las proteínas de la membrana externa (ME)

4.4.1. Obtención de la fracción de ME

En una primera etapa del trabajo, la fracción de ME y membrana interna (MI) de *S. typhi* Ty2 silvestre crecida en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, se extrajeron por tres métodos diferentes, con el objeto de comparar los perfiles de proteínas obtenidos en cada caso y así escoger el método más apropiado para nuestras futuras investigaciones.

La extracción de la ME y MI de bacterias Gram negativas está basada principalmente en su diferencias de densidad y de solubilidad en detergentes como Triton X-100 (no iónico) o Sarcosyl (aniónico), debido a la diferencia en el contenido de lípidos de cada una (Nikaido, 1994).

El primer método de extracción que se probó, fue el de Schnaitman (1971) modificado por Lobos y Mora (1991), el cual estaba siendo usado de forma rutinaria en nuestro laboratorio. Este método está basado en la insolubilidad de la ME en detergentes no iónicos (Triton X-100), mientras que el LPS se encuentre estabilizado con altas concentraciones de Mg^{+2} . Las bacterias se cultivaron en medio LB entre 0,2–0,25 OD_{600} , se pusieron sobre hielo por 10 min y luego se cosecharon por centrifugación a 3000 x g por 10 min. El pellet bacteriano se lavó dos veces con 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y se resuspendió en 1,5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 10mM). Entonces se rompió las bacterias por sonicación (80-40 seg sin pulsos, con duty cycle 70% y microtip limit 5) sobre hielo. De inmediato se agregó PMSF 2 mM final. El debris celular y bacterias enteras se removieron por centrifugación a 3000 x g por 5 min (centrífuga Eppendorf 5415c). El sobrenadante que contenía las fracción de membrana total y la fracción citoplasmática soluble se centrifugó a 12000 x g por 45 min a 4°C con el objeto de sedimentar la fracción de membrana completa, la cual se resuspendió en 500 μ l de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 10 mM; Triton X-100 2 %, se incubó por 45 min a 37 °C, agitando de vez en cuando en vórtex. La fracción de ME (insoluble) se obtuvo por centrifugación a 12000 x g por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 50–80 μ l de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0; SDS 1 %. La fracción de MI (sobrenadante) se precipitó con TCA al 10 % final o con 3 volúmenes de acetona

por 1 h a 4°C, se centrifugó a 12000 x g por 30 min y el sedimento de proteínas se resuspendió en 50–80 µl de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0; SDS 1 %.

El segundo método de extracción que se probó fue el descrito por Michiels y col., (1990), el cual había sido utilizado con éxito para aislar ME, MI y proteínas de secreción o Yops de *Yersinia*. El pellet bacteriano se trató de la misma forma que la descrita, hasta luego de la sonicación, donde el sobrenadante que contiene la fracción membrana total y la fracción citoplasmática, se ultracentrifugó a 40000 x g por 60 min a 4°C (rotor Ty40, Beckmann). El pellet de membranas obtenido se trató con 500 µl de tampón (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; Triton X-100 2 %) por 45 min a 37 °C y luego se centrifugó a 12000 x g por 30 min a temperatura ambiente. La fracción de ME se resuspendió en 50–80 µl de tampón (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; SDS 1 %). La fracción de MI se precipitó con 10 % TCA o 3 volúmenes de acetona y se resuspendió en 50–80 µl de tampón (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; SDS 1%).

El tercer método utilizó el detergente aniónico Sarcosyl, en ausencia de Mg⁺², para la solubilización diferencial de la MI de la ME, donde ésta última permanece insoluble (Nikaido, 1994). Al parecer, el Sarcosyl tiene una densidad de carga por área de superficie similar a la del LPS, lo que impediría la desagregación de la ME. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3000 x g por 10 min a 4°C, se lavaron dos veces con 1,5 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,2 y el sedimento se resuspendió en 1,5 ml del mismo. Se sonicó sobre hielo por 80 s e inmediatamente se agregó PMSF 2 mM final, se centrifugó a 3000 x g por 5 min y la fracción de membrana se colectó por centrifugación a 12000 x g durante 45 min a 4°C, para luego resuspender en 500 µl de solución de Sarcosyl al 10% e incubar por 30 min a 37°C. La fracción de

ME se obtuvo por centrifugación a 12000 x g por 45 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 50–80 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,2. La fracción de MI se precipitó con 10 % de TCA o con 3 volúmenes de acetona. Finalmente, se resuspendió en 50–80 µl de tampón Tris-HCl 20mM pH 7,2.

4.4.2. Determinación de proteínas

En las primeras etapas del trabajo se intentó cuantificar las proteínas de la fracción de ME y MI por el método de Lowry modificado, pero no se obtuvo concordancia con la cantidad de proteínas cuantificada y lo observado en los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie R-250. Por lo tanto, la cantidad de proteínas cargada en cada carril, se ajustó en base a la intensidad de la porina estructural OmpA. Más tarde, se implementó la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico o BCA (Pierce), el cual está diseñado para cuantificar proteínas en presencia de detergentes y otras sustancias que típicamente interfieren con la cuantificación.

4.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, unidimensionales (1-D)

La fracción de proteínas de la ME y MI, obtenidas por los tres métodos descritos con anterioridad, se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 12,5 %-SDS según Laemmli (1970). Se utilizó las siguientes cantidades y soluciones madre:

Gel resolutivo	12,5 %	Gel concentrador	5 %
Solución B (ml)	2,64	Solución C (ml)	1,75
Solución A (ml)	4,38	Solución A (ml)	1,75
Agua bidestilada (ml)	2,11	Agua bidestilada (ml)	3,60
Solución D (μ l)	550	Solución D (μ l)	350
Solución E (μ l)	105	Solución E (μ l)	70
Solución F (μ l)	200	TEMED (μ l)	15
TEMED (μ l)	15		
Volumen final (ml)	10	Volumen final (ml)	5

A: Solución de acrilamida-bisacrilamida 30 % : 0,8 %.

B: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.

C: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.

D: Persulfato de amonio 10 % (PSA).

E: SDS 10 %.

F: NaCl 5 M.

Las muestras se prepararon agregando el tampón de carga 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; glicerol 20 %; SDS 4%; β -mercaptoetanol 0,05 %; azul de bromofenol 0,002 %) y calentando a 100°C por 5 min. Se cargó entre 8 y 20 μ l de estas muestras, de modo de agregar entre 10-20 μ g de proteína por carril.

La electroforesis se efectuó entre 40 y 60 mA, en tampón Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM pH 8,4; SDS 1%, usando estándares de proteínas como referencia (7B, Sigma). Luego el gel se sumergió en solución de tinción (azul de Coomassie R-250 0,1 %; ácido acético 0,1 %; isopropanol 25 %) durante 4-8 h y se destiñó en solución de ácido acético al 10 %.

4.4.4. Análisis del perfil electroforético (1-D) de las proteínas de la ME

Las proteínas de la ME extraídas de bacterias crecidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, luego fraccionadas en geles SDS-PAGE se tiñieron con azul de Coomassie y se analizaron por densitometría mediante el programa NIH Image, con el objeto de determinar las proteínas mayormente inducidas por la condición ambiental anóxica.

4.4.5. Electroforesis en geles bidimensionales (2-D) de las proteínas de la ME

La fracción de ME de *S. typhi* Ty2 silvestre y mutantes se analizó también por electroforesis bidimensional según O'Farrell (1975) con algunas modificaciones introducidas por Hochstrasser y col., (1988). Las bacterias se crecieron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, según las condiciones establecidas. Se aisló las proteínas de la ME según Lobos y Mora (1991) (método elegido) y se realizó la primera etapa o 1-D, correspondiente al isoelectroenfoque (IEF). Este se hizo en tubos de vidrio (130 x 2,5 mm; BioRad), haciendo siempre un gel de 10 cm de largo. El gel para el IEF se preparó con 5,0 g de urea (Sigma); 1,5 ml de solución madre de acrilamida 30 % (28,38 % acrilamida : 1,62 % bisacrilamida; BioRad); 0,5 ml de NP-40 10 % (Sigma); 0,15 g de CHAPS (Sigma); 3,25 ml de agua desionizada y un 2 % final de mezcla de anfólitos (0,4 ml rango pH 4 a 7; Sigma y 0,1 ml rango pH 3 a 10; BioRad). Se agitó hasta completa disolución de la urea y se agregó 60 µl de PSA 10 %, llevando a 10 ml finales. Entoces se desgasificó la mezcla por 1 min al vacío, se adicionó inmediatamente 58 µl de TEMED y se dispensó en cada capilar con pipeta Pasteur, evitando la formación de

burbujas desde el fondo del capilar, para luego cubrir la superficie con una alícuota de isopropanol o agua desionizada hasta gelificación. Lo siguiente consistió en cubrir el gel con una solución de urea 8 M por 2 h, la cual se reemplazó después por 30 μ l de amortiguador de lisis (urea 9,5 M; NP-40 2 %; anfolitos 2 % (1,6 % pH 4 a 7 y 0,4 % pH 3 a 10); β -mercaptoetanol 5 %) por 2 h más. Los tubos se pusieron entonces en la cámara de electroforesis (BioRad para 2-D) y se volvió a reemplazar la solución por 20 μ l de tampón de lisis fresco, el cual se cubrió con 0,02 M de NaOH, correspondiente al amortiguador de corrida que va en la parte superior de la cámara (desgasificar). La parte inferior del capilar se cubrió con membrana de diálisis. El tanque inferior se llenó con solución 0,01 M de H_3PO_4 . Enseguida se realizó la pre corrida de los geles por 15 min a 200 V; 30 min a 300 V y 30 min a 400 V, para luego retirar el buffer de lisis de los tubos y cargar la muestra disuelta en el mismo tampón, en un volumen de 20 a 30 μ l, correspondiente a alrededor de 20 a 30 μ g de proteínas de la ME. Esta se cubrió con 20 μ l de tampón 9 M urea; 1 % de mezcla de anfolitos (0,8 % rango pH 5 a 7 y 0,2 % rango pH 3 a 10). Finalmente, el IEF se realizó por 12 a 14 h a 400 V y luego 1 h a 800 V, completando un total de 5000 a 10000 V/h. Se removió los geles de los tubos por presión con una jeringa con agua. En esta etapa los geles se congelaron a $-20^\circ C$ y luego se sumergieron en 5 ml de tampón SDS de equilibrio (glicerol 10 %; β -mercaptoetanol 5 %; SDS 2,3 %; Tris-HCl 0,0625 M) por 1 h con agitación suave. Uno de los geles enfocados se procesó para realizar una curva de pH/cm de gel y así poder estimar en forma aproximada el pI de las proteínas analizadas. La segunda etapa o 2-D, correspondió a la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS según las condiciones establecidas en el pto. 4.4.3. Esta se hizo en un formato grande, donde el gel cilíndrico

se depositó sobre el gel concentrador de modo que las proteínas de pI similar, se puedan separar por tamaño molecular en esta 2-D. Los geles se tiñieron con azul de Coomassie R-250.

4.4.6. Marcación *in vivo* de las proteínas de superficie de *S. typhi* con NHS-Biotina

El reactivo éster de N-hidroxisuccinimidobiotina (NHS-biotina) (EZ-Link™ NHS-Biotin, Pierce) conjugado a compuestos biotinilados ha sido utilizado para marcar selectivamente proteínas de la envoltura de *E. coli in vivo*. El NHS-biotina (Figura 1) forma enlaces tipo amida con aminas primarias. La reacción ocurre por ataque nucleofílico de una amina desprotonada sobre el éster, resultando en la formación de un enlace tipo amida y la liberación del NHS. La reacción se favorece a pH alcalino, lo que mantiene a las aminas desprotonadas.

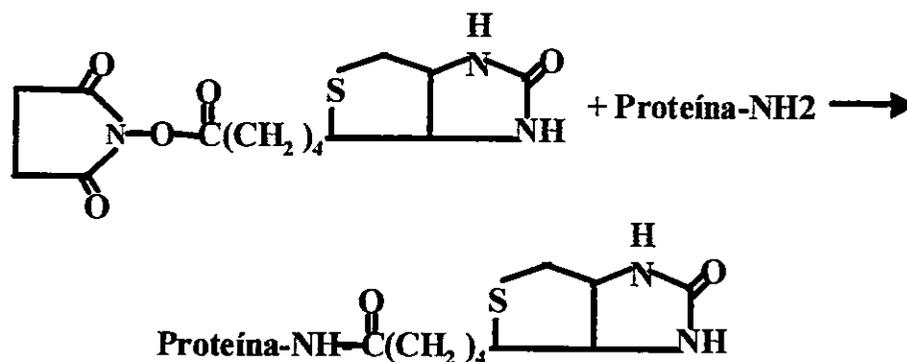


Figura 1. Estructura del compuesto NHS-Biotina [MW 341,38 (Pierce)].

Las bacterias se cultivaron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas según lo indicado con anterioridad, para luego cosechar por centrifugación a 3000 x g por 15 min a 4°C. El pellet bacteriano se lavó con 1,5 ml de tampón HM [HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-(1-ácido etansulfónico) 10 mM pH 7; MgSO₄ 1 mM] frío, se centrifugó a 12000 x g 10 min y se resuspendió en 1 ml de tampón HM ajustando la concentración a 3 x 10⁹ bacterias/ml, basándose en que 0,1 OD₆₀₀ es equivalente a 10⁸ bacterias/ml. Entonces se agregó 0,12 ml de una solución fresca de N-hidroxisuccinimida éster de biotina (NHS-Biotin; Pierce Chemical Co.) 10 mg/ml (disolver 5mg en 70 µl DMSO, llevar a 500 µl con tampón HM). Se incubó por 20 min con agitación suave a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g 10 min. Se lavó el pellet una vez con tampón HM y una segunda vez con tampón Tris-HCl 10mM pH 8,0, para hacer reaccionar el exceso de NHS-Biotin. Concluida la marcación con biotina, las bacterias se procesaron para obtener las fracciones de membrana según Lobos y Mora (1991).

Para la detección de los polipéptidos biotinilados, las proteínas de ME y MI se fraccionaron en geles de poliacrilamida-SDS y se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa (NC) en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20 %) según Towbin y Godpon (1979). Luego, la NC se trató 1 h con solución de bloqueo (tampón fosfato pH 7,2; BSA 0.1 %, Tween 20 0,1 %) a temperatura ambiente y se incubó con 0.5 µg/ml de peroxidasa conjugada a avidina (Sigma) en tampón fosfato pH 7,2; 0.1 % BSA; 0.1 % Tween 20. Entonces, la membrana se lavó tres veces en el tampón fosfato y se reveló con 3,3'-Diaminobenzidina-H₂O₂ (Sigma Fast™).

4.5. Identificación de las proteínas de la ME de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis

4.5.1. Transferencia de proteínas a membrana PVDF y secuenciación N-terminal

Las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecidas en anaerobiosis, se extrajeron por el método de Lobos y Mora (1991) en presencia de un cocktail de inhibidores específicos de proteasas bacterianas (Sigma) y se fraccionaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5 % (1-D), según lo indicado con anterioridad. Concluida la electroforesis el gel se sumergió en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 15 % grado HPLC (Merck)) por algunos segundos. Simultáneamente, se trató la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Esta se humedeció 10 seg en metanol grado HPLC, se lavó en agua bidestilada estéril y luego se sumergió en tampón de transferencia (Pluskal y col., 1986). Entoces se montó el sistema de electrotransferencia, tomando la precaución de manipular todo el material con guantes y pinzas. La transferencia de proteínas de la ME se llevó a cabo por 3 h entre 120 a 150 mA a voltaje constante. Concluida esta etapa, se lavó la membrana por 5 min en agua, se tiñó por 1 a 2 min en solución 0,05 % azul de Coomassie R-250 en 50 % metanol, se destiñó en 50 % metanol por 5 min dos veces y por último se lavó con agua, dejando secar al aire. Entonces se secuenció el extremo N-terminal de las proteínas mayormente inducidas en anaerobiosis mediante degradación secuencial de Edman. Este servicio fue realizado por Frank Masiarz, del grupo de análisis de proteínas de Chiron Corporation, Emeryville, CA. USA.

4.5.2. Análisis de las secuencias N-terminales de las proteínas seleccionadas

Las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la región N-terminal de cada proteína se analizaron en las bases de datos disponibles en NIH-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y en Sanger Centre, dentro de la sección genoma de *S. typhi* (<http://www.sanger.ac.uk/DataSearch>). Estas permiten analizar las secuencias de proteínas “desconocidas”, compararlas y alinearlas con las que se encuentran en las bases de datos mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1997), el cual finalmente entrega resultados en base a sus similitudes.

4.6. Técnicas de genética bacteriana

4.6.1. Construcción de *S. typhi* Ty2 mutante en el gen *aipI* y *S. typhimurium* 14028s mutante en el gen *adhE*

El vector suicida pNM2 (derivado del pGP704) se usó en ambos experimentos de inactivación génica, tanto en *S. typhi* Ty2 como en *S. typhimurium* 14028s silvestre. Las bacterias competentes se electroporaron con el plasmidio pNM2, se cultivaron en medio líquido LB por 1 h a 37°C con agitación y luego se sembraron sobre agar LB suplementado con ampicilina 30 µg/ml. Se seleccionó las colonias resistentes al antibiótico, las cuales se originarían por un sólo evento de recombinación homóloga entre el plasmidio y el cromosoma de *S. typhi* o *S. typhimurium*, habiendo generado así

una inserción en el alelo silvestre *aipI* (mutante TYT2006) o *adhE* (mutante NPM1), respectivamente.

4.6.2.. Caracterización de las mutantes TYT2006 y NPM1

4.6.2.1. Curva de crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis

Se sembró 10 ml de caldo LB con 50 μ l de un cultivo saturado de *S. typhi* Ty2 silvestre y la mutante TYT2006. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) para la condición aeróbica y en tubos spectronic cubiertos con una capa de aceite mineral sin agitación para la condición anaeróbica. Se midió la absorbancia a 600nm en el tiempo y se graficó OD₆₀₀ vs tiempo (h).

4.6.2.2. Batería bioquímica, movilidad y LPS

Se ensayó en una batería bioquímica clásica las cepas mutantes *S. typhi* (TYT2006) y *S. typhimurium* (NPM1) generadas, la cual incluyó la prueba de movilidad en agar semisólido. Los medios se sembraron a partir de una colonia crecida sobre agar LB. Se incubó por 24 a 48 h a 37°C y se leyó los resultados obtenidos. Además se evaluó el estado del LPS mediante PAGE-SDS. Para ello se aisló y fraccionó el LPS de las cepas silvestres y mutantes en geles al 12 % de poliacrilamida-SDS, los cuales se tiñieron con nitrato de plata. Este análisis se realizó en el laboratorio de la Dra. Inés Contreras. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

4.6.3. Obtención de una colección de fusiones génicas mediante inserción del transposón *TnphoA* en el cromosoma de *S. typhi*

La fusión génica *phoA* se basa en que la fosfatasa alcalina derivada de *E. coli*, para ser activa, debe localizarse extracitoplasmáticamente. Manoil y Beckwith (1985) explotaron esta propiedad e insertaron un fragmento de restricción del gen *phoA* cerca de un extremo del transposón Tn5, para crear el *TnphoA*. Este puede originar fusiones génicas al insertarse al azar en un gen cromosomal o fragmento génico clonado. La proteína híbrida expresada, muestra actividad PhoA, sólo si el gen blanco codifica para una proteína de membrana, periplasma, membrana externa o secreción (Figura 2). Debido a que esta clase de proteínas han sido reconocidas como las más involucradas en la patogénesis bacteriana, el uso del *TnphoA* provee de un fuerte enriquecimiento en la obtención de mutantes en genes de virulencia.

Las mutantes *S. typhi zxx::TnphoA* se obtuvieron por transducción con un lisado del fago MudP22::*TnphoA* de la siguiente manera. Se cultivó la cepa dadora, lisógena de MudP22 (MST2002 y MST2001), hasta saturación (Figura 3). Se inoculó 0,1 ml de cada cultivo sobre 5 ml de medio LB suplementado con medio E (50x E: H₂O desionizada 670 ml; 10 g MgSO₄ x 7H₂O; 100 g ácido cítrico x H₂O; 500 g K₂HPO₄; 175 g NaH₂PO₄ x 2H₂O) y glucosa 2 g/L. Se incubó con agitación a 37°C por 90 min y se agregó 5 µl de Mitomicina C (Sigma) 2 mg/ml. Se continuó la agitación durante 3 h o hasta observar evidente lisis bacteriana. El debris se sedimentó por centrifugación a 3000 x g 10 min, mientras que el sobrenadante se esterilizó por filtración (0,45 µm). Después se adicionó gotas de cloroformo y se almacenó a 4 °C. Se usó dos cepas receptoras de *S.*

typhi, ambas con una mutación en el gen de fosfatasa ácida inespecífica *phoN* (TYT1415 y TYT1482). Estas receptoras se crecieron en 2 ml de LB hasta saturación y se infectaron con tres diluciones de cada uno de los lisados MudP22::Tn*phoA* diluídos 1:50 de la siguiente manera:

Tabla 2. Protocolo de transducción con MudP22.

Placa	Receptora (ml)	Lisado (ml)
A	0,1	--
B	0,1	0,05
C	0,1	0,10
D	0,1	0,20
E	--	0,20

Se mezcló suavemente e inmediatamente se plaqueó sobre medio agar LB. Se incubó por 4 h (expresión fenotípica de Kan) y luego se hizo replicas en placa sobre el medio de selección Kan 50 µg/ml y XP 40 µg/ml. Esto asegura que las colonias no sean gemelas. Se incubó a 37°C por 24 h y se contó el número total de colonias en cada placa (blancas y azules), lo que se repitió al cabo de 48 y 72 h.

4.6.3.1. Selección de fusiones génicas, mutantes putativas en proteínas de membrana

Para determinar si los genes mutados por la inserción del transposón Tn*phoA* correspondían a genes que codifican para proteínas de exportación (ME, MI, periplasma o secreción), se analizó el cambio de coloración de las colonias en presencia del indicador XP en las placas de selección. Se rescató todas las colonias que presentaron

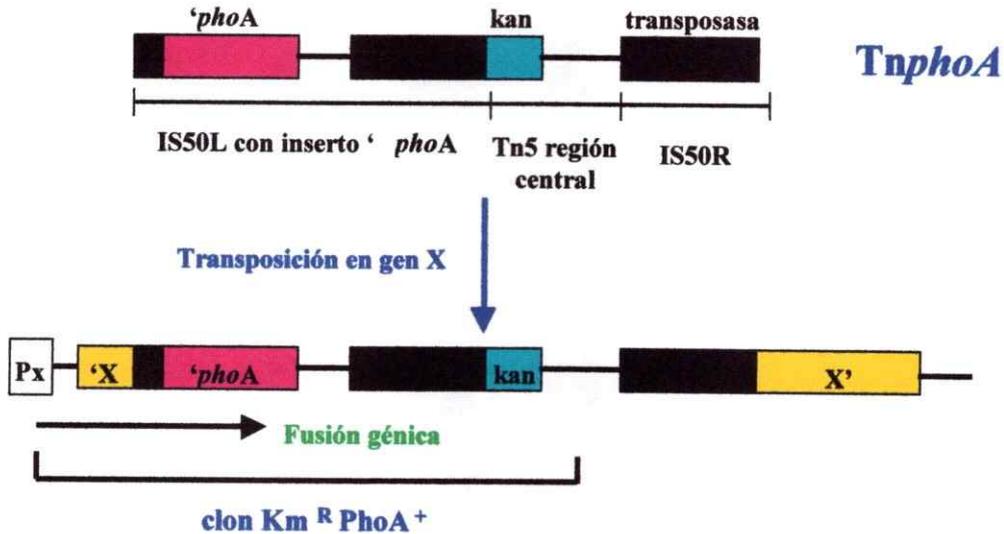


Figura 2. Estructura del transposón *TnphoA*. En la parte superior de la figura se muestra un esquema del transposón *TnphoA* (Manoil y Beckwith 1985). Se indica la unión de un fragmento de restricción del gen '*phoA*' a la región IS50L del transposón Tn5, para generar este nuevo transposón, que puede insertarse al azar en un gen X, ubicado en el cromosoma o plasmidio de una bacteria. Esta inserción, cuando ocurre en el marco de lectura correcto, crea una fusión génica activa, que permite la expresión y exportación de esta proteína híbrida.

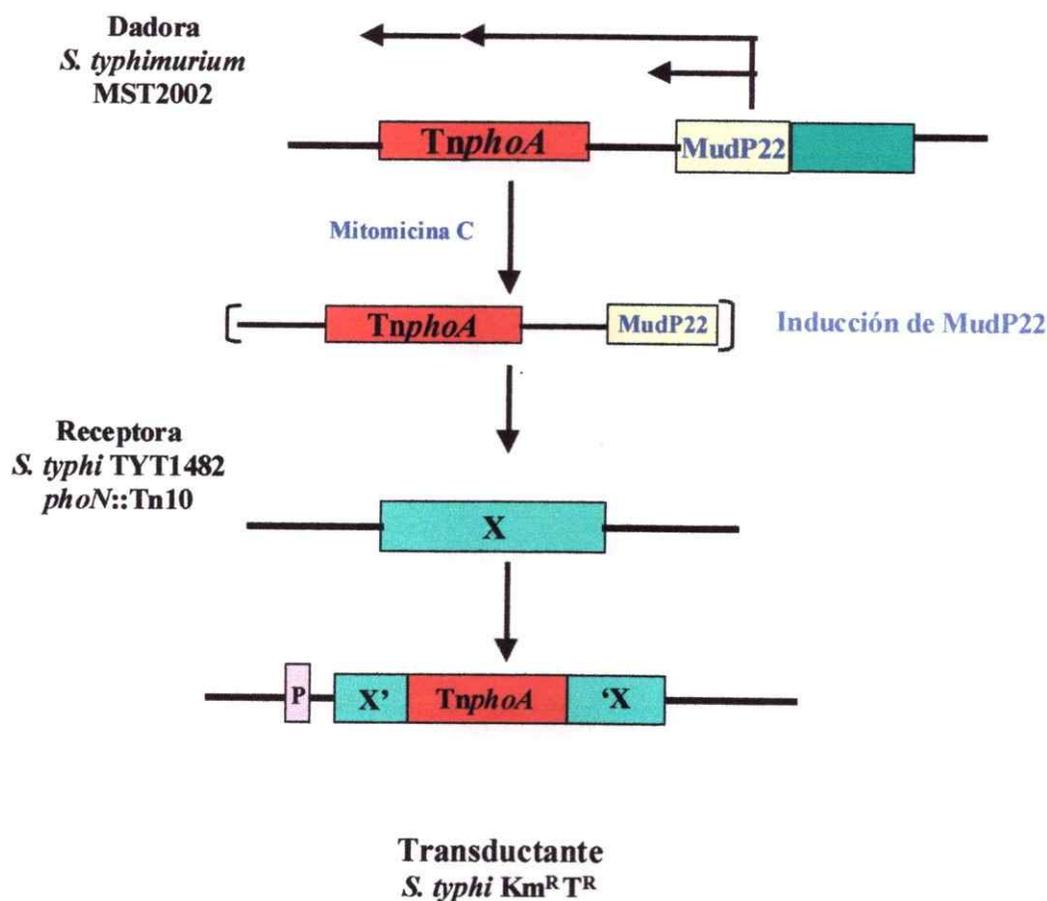


Figura 3. Estrategia de mutagénesis de *S. typhi* Ty2 por inserción al azar del transposón *TnphoA*. Se indujo la lisis de la cepa dadora lisógena *S. typhimurium* MudP22 (MST2002) con Mitomicina C, la cual lleva cerca del sitio *pac* el transposón *TnphoA*. Con este lisado, enriquecido en *TnphoA*, se infectó la cepa receptora *S. typhi* *phoN* (TYT1415 o TYT1482). La colección de 4000 transductantes obtenidas se seleccionaron por resistencia a kanamicina y tetraciclina. Las cepas *S. typhi::TnphoA*, potenciales mutantes en genes de proteínas de membrana, se seleccionaron además de la resistencia a los antibióticos, por el color azul de la colonia.

coloración azul intensa al cabo de 24, 48 y 72 h, asignándoseles un número en el cepario del Dr. Guido Mora (TYT1952 a 1985).

4.6.3.2. Selección de fusiones génicas XP⁺ reguladas por anaerobiosis.

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Se analizó si los genes interrumpidos en esta colección de mutantes *S. typhi* $\Delta x::TnpA$ (TYT1952 a TYT1985) son regulados por la condición de baja disponibilidad de oxígeno. Para ello se creció las bacterias en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, según lo descrito en el punto 4.2., se midió la actividad de fosfatasa alcalina y se determinó la inducción por la condición ambiental anóxica. Básicamente se siguió el procedimiento descrito por Behlau y Miller (1993), adaptado para determinaciones a partir de bacterias completas. A partir de un cultivo crecido hasta saturación, se inoculó 5 ml de medio LB con 50 μ l de preinóculo. Se cultivó en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, entre 0,2-0,3 OD₆₀₀, se centrifugó 1 ml de cada cultivo por 5 min a 12000 x g, el sedimento bacteriano se lavó dos veces con tampón Tris-HCl 1 M pH 8,0 y se resuspendió en 1 ml del tampón. Se tomó 500 μ l de la suspensión bacteriana, la cual se permeabilizó con 10 μ l de SDS 0,1 % más 10 μ l de cloroformo. Se agitó en vórtex por 30 s e inmediatamente se adicionó 200 μ l de sustrato para fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato o XP 0,04 M). Se incubó a 37°C, tomando el tiempo transcurrido hasta la aparición de color (amarillo), entonces se detuvo la reacción con 200 μ l de K₂HPO₄ 1 M. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad de fosfatasa alcalina se expresó en Unidades Miller según lo siguiente:

$$\text{Unidades Miller} = (A_{420} - 1,75 \times A_{550}) \times 1000 / \text{OD}_{600} \times V \times t$$

A_{420} : Absorbancia medida a 420 nm (p-NO₂ fenolato).

t: Tiempo de reacción en min.

A_{550} : Densidad óptica de restos celulares.

1,75: Factor de corrección que compensa la difracción de la luz producida por las bacterias.

V: Volumen del cultivo en ml.

4.6.4. Construcción de la cepa *S. typhi* *ims50::Tn10*, mutante en un gen con similitud a *adhE* de *E. coli*

La cepa mutante, *S. typhi* *ims50::Tn10* (TYT2010), se construyó por transducción con un lisado del fago P22 HTint crecido en la cepa dadora *S. typhimurium* *ims50::Tn10* (NPM3), según las recomendaciones de Maloy (1990). La inserción *ims50::Tn10* se movió primero desde la cepa *S. typhimurium* 14028r, alias MS1 (Bäumler y col., 1994), a *S. typhimurium* LT2 (generando la mutante NMP3), por electroporación con fragmentos de DNA cromosomal lineal aislado de la cepa MS1, según el procedimiento descrito por Toro y col., (1998a) (pto. 4.6.7.). Las transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina. La región interrumpida por el Tn10, en la cepa *S. typhimurium* MS1, corresponde al gen *eutE* (centisoma 50) (Bäumler y col., 1994), el cual presenta similitud con el gen *adhE* de *E. coli* y forma parte del operón para la utilización de la etanolamia (Stojiljkovic y col., 1995).

4.6.5. Preparación de lisados del fago P22 Htint

Los lisados se prepararon según el método descrito por Maloy (1990). Se creció un inóculo de la cepa dadora hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,2 y 0,3 OD₆₀₀. Se mezcló 1 ml de este cultivo con 4 ml de medio para fago P22 HTint (LB suplementado con medio E 1x; glucosa 2 g/L y fago P22 HTint 10¹⁰ UFP/ml, propagado en la cepa LT2) y se incubó por 8 a 16 horas con agitación vigorosa (200 rpm) a 37°C. Los lisados se centrifugaron por 20 min a 3000 x g, se esterilizaron por filtración (0,45µm) o agregando gotas de cloroformo y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

4.6.6. Preparación de lisados MudP22

Se tomó 0,1 ml de un cultivo saturado (inóculo) de la cepa lisógena de MudP22 (MST2002 y MST2001), que contiene al transposón *TnphoA* y el plasmidio (Amp^R) con el gen 9 para la cola del fago y se inoculó en 5 ml de LB suplementado con medio E y glucosa 2 g/L. Se incubó con agitación a 37°C por 90 min y se agregó 5µl de Mítomicina C 2 mg/ml. Se continuó con el cultivo durante 3 h o hasta observar evidente lisis bacteriana. El lisado se centrifugó a 13000 x g por 5 min para eliminar los restos bacterianos, mientras que el sobrenadante se esterilizó por filtración por 0,45 µm, luego se adicionó unas gotas de cloroformo y se almacenó a 4 °C.

4.6.7. Transducciones

Para hacer transducciones entre cepas de *S. typhimurium* se siguió básicamente el protocolo descrito por Maloy (1990). Para ello, se mezcló 10 µl de un lisado de P22, obtenido a partir de la cepa dadora, con 200 µl de un cultivo en fase exponencial temprana de la cepa receptora. La mezcla se incubó por 30 min a 37°C sin agitación y luego se sembró en placas de agar LB suplementadas con el (los) antibiótico(s) apropiado(s) para la selección. Cuando la “marca” a transducir requirió expresión fenotípica (resistencias a Kan y Amp), la mezcla se incubó por 30 min a 37°C sin agitación, luego se adicionó 500 µl de caldo LB fresco y se dejó en incubación por 45 min a 37°C con agitación vigorosa, para finalmente sembrar sobre el medio de selección. Los clones transductantes obtenidos en *S. typhimurium* se aislaron y purificaron en placas indicadoras EBU (LB suplementadas con glucosa 2,5 g/L; K₂HPO₄ 5 g/L; azul de Evans 1,25 mg/L; fluoresceína de sodio 2,5 mg/L) para descartar la presencia de bacterias pseudolisógenas de P22 y con ello también descartar la presencia de lisógenos de P22, comprobando la sensibilidad al fago mutante P22 H5 mediante la técnica de líneas cruzadas (Cross-streaking) (Maloy, 1990).

Las transducciones desde *S. typhimurium* a cepas de *S. typhi* se efectuaron en forma similar a la descrita, sólo que usando una alta multiplicidad de infección, según Zahrt y col., (1994). En este caso no es posible “limpiar” los clones transductantes como se describió para *S. typhimurium*, ya que P22 no produce lisis en *S. typhi*.

4.6.8. Transferencia de marcadores genéticos entre cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium* mediante electrotransformación

La transferencia de una mutación a un fondo genético limpio es un paso esencial en el análisis genético y construcción de cepas. En el caso de *S. typhi* la transferencia de genes está impedida, debido a la falta de fagos transductores. Este problema fue parcialmente superado mediante el método descrito por Toro y col., (1998a). Este permite transferir una mutación o marcador genético a evaluar desde la cepa mutante de *S. typhi* (dadora) a una cepa receptora de *S. typhi* o *S. typhimurium* silvestre, a través de la electroporación de DNA cromosomal lineal, aislado de la bacteria dadora. El DNA transferido puede recombinar con la región homóloga en el cromosoma de la cepa silvestre. De esta manera se construyeron la cepa backcross *S. typhi* TYT2007 y la cepa *S. typhimurium* NPM3. Primero, se aisló el DNA cromosomal de las cepas dadoras, *S. typhi aipl::pNM2* (TYT2006) y *S. typhimurium ims50::Tn10* (MS1), se resuspendió en agua desionizada estéril y una alícuota se agitó en vórtex por 2 min, de modo de romper el DNA en fragmentos. Entonces, se tomó entre 300 a 500 ng de este DNA, se mezcló con 50 µl de bacterias competentes (*S. typhi* Ty2 o *S. typhimurium* LT2) y se electroporó con un pulso de 12,5 kV/cm (2,5 kV; 200Ω; 25 µF) en cubetas de 0,2 cm (BioRad) frías. Se adicionó 1 ml de medio LB, se incubó 1 h a 37°C con agitación y se plaqueó sobre medio selectivo (Amp 30 µg/ml o Tet 50 µg/ml). Se recuperó las colonias resistentes a ampicilina y a tetraciclina, respectivamente.

4.7. Técnicas moleculares

En general, el análisis de DNA y su clonamiento, que incluye la preparación de DNA plasmidial, DNA cromosomal, digestión con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, ligaciones y PCR, entre otros procedimientos, se realizaron de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 1992) o en base a las recomendaciones de los fabricantes.

4.7.1. Clonamiento de la región 5' de los genes *aipI* de *S. typhi* y *adhE* de *S. typhimurium* en pBluescript y pGP704

Fundamentados en la alta similitud (100 %) presentada por la región N-terminal de la proteína AipI (30 aá) con la alcohol deshidrogenasa (AdhE) de *S. typhimurium* y *E. coli*, se seleccionó la secuencia nucleotídica comunicada para el gen *adhE* de *S. typhimurium* en GenBank (U68173), para diseñar los partidores más adecuados para amplificar la región 5' del gen *aipI* de *S. typhi* mediante PCR. Estos incluyeron la región comprendida entre los nucleótidos 60 y 520 (Figura 4). Se utilizó como templados los DNAs cromosomales de *S. typhimurium* LT2 (control positivo), *S. typhi* Ty2 y *E. coli* K-12. A ambos partidores se les agregó sitios *EcoRI* y *BamHI* en sus extremos 5', de modo de, poder clonar directamente los productos de amplificación obtenidos por PCR en los vectores correspondientes.

Primer-N: 5'GCCCGAATTCGCCAGTTTCACTCAAGAACA3'.

Primer-C: 5'TGGTGGATCCACGTTAGACAGTTCTACCGG3'.

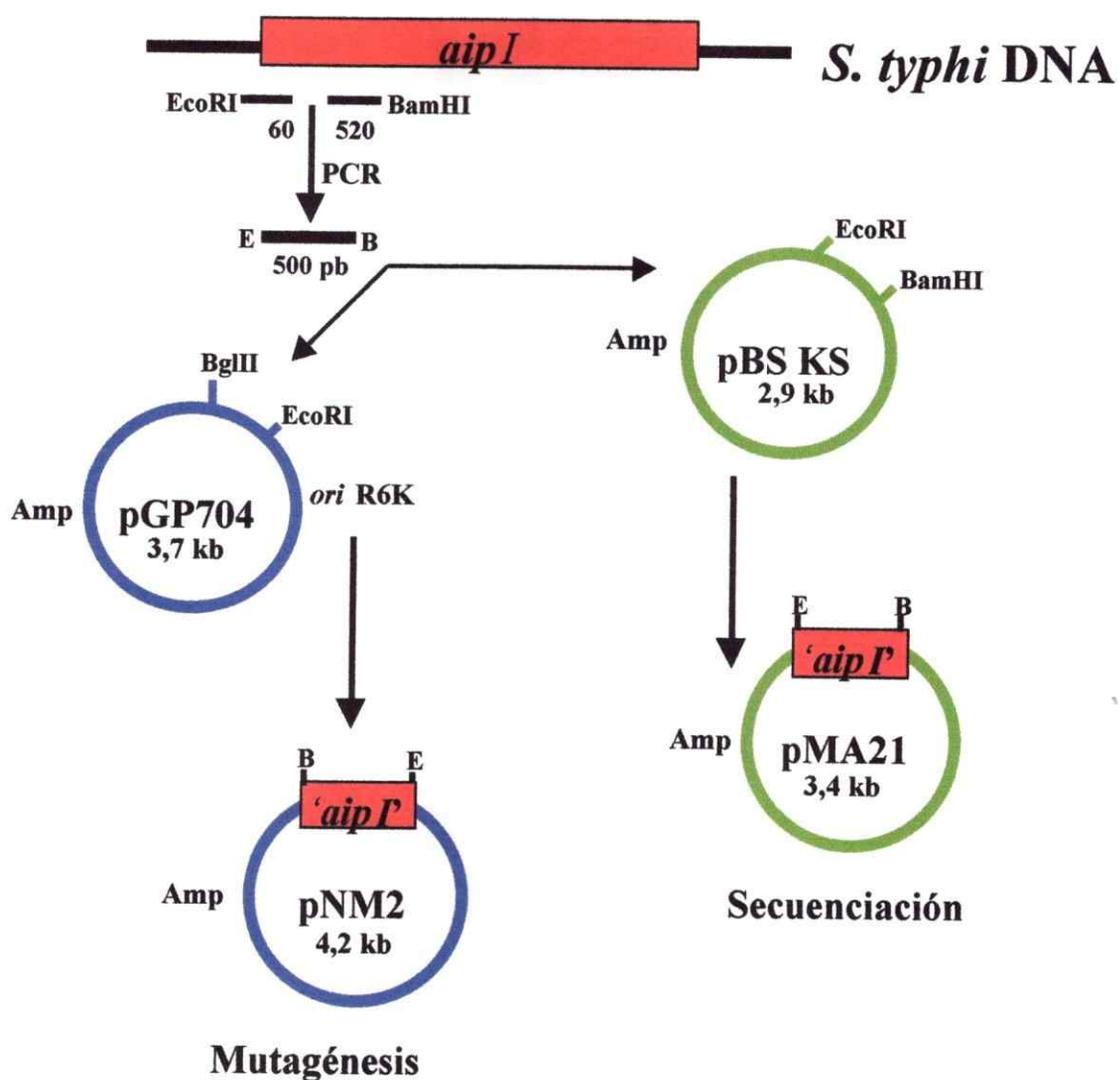


Figura 4. Esquema de clonamiento de los productos de amplificación obtenidos por PCR en los vectores pBluescript y pGP704. Se muestra la estrategia utilizada para el clonamiento del fragmento 5' del gen *aipI* obtenido por PCR desde el cromosoma de *S. typhi* Ty2. El producto de amplificación de 500 pb se clonó directamente en el vector pBluescript digerido con *EcoRI* y *BamHI* y en el vector suicida pGP704 digerido con *EcoRI* y *BglII*, utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

La mezcla de reacción para PCR consistió entre 50 a 100 ng de DNA genómico, 10-20 pmoles de cada partidor, 0.2 mM de deoxinucleósidos trifosfato en mezcla, 4 mM MgCl₂ y 1,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega o Gibco) en 50 µl de volumen de reacción. Las condiciones de amplificación fueron de: 94 °C por 10 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min (desnaturación), 55 °C por 45 s (hibridación) y 72 °C por 1 min (extensión), luego 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación (500 pb) obtenidos a partir de los templados, DNA genómico de *S. typhimurium* LT2 y *S. typhi* Ty2, se clonaron entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector plasmidial pBluescript KS II (+/-) (Stratagene), para generar los plasmidios pMA12 y pMA21, respectivamente. Por otra parte, el producto de amplificación obtenido a partir del cromosoma de *S. typhi* se clonó entre los sitios *Bgl*II y *Eco*RI del vector suicida pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988), generando el vector suicida pNM2 (Figura 4.), el cual se usó para mutagenizar los genes *aipI* y *adhE* de *S. typhi* y *S. typhimurium*, respectivamente. En ambos casos se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (GibcoBRL) para ligar los productos de amplificación al vector pGP704, digerido con las enzimas de restricción correspondientes. Los productos de amplificación obtenidos, fueron previamente purificados con el kit ConcertTM gel extraction system (Gibco).

4.7.2. Secuenciación de los productos de amplificación del gen *aipI* y *adhE* de *S. typhi* y *S. typhimurium*

Los insertos de DNA clonados en los plasmidios pMA12 y pMA21, correspondientes a la region 5' de los genes *adhE* y *aipI* de *S. typhimurium* y *S. typhi*, se

secuenciaron por el método de Sanger con algunas adaptaciones. Las primeras 80 pb se secuenciaron en forma manual con el kit *fmol* DNA Sequencing System de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este consiste en una modificación del método clásico de secuenciación (basado en la reacción de terminación de cadena de Sanger), usando múltiples ciclos de secuenciación realizados por una DNA polimerasa termo estable. Se inicia con la desnaturación del DNA templado por calor, hibridación del partidador, extensión del partidador por la DNA polimerasa termo estable en cada molécula de templado hasta que un didesoxinucleótido es incorporado a la cadena. La doble hebra es nuevamente desnaturada, lo cual permite un nuevo ciclo de hibridación y síntesis. Este proceso se repite por 20 a 30 ciclos. Los fragmentos obtenidos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea y revelados mediante autoradiografía. Los partidadores universal o forward y reverse (Stratagene) se marcaron con [γ - 32 P]ATP (3 μ Ci/pmol). La mezcla de reacción, consistió de 1,5 pmol del partidador, 40 fmol de DNA templado (100 ng de DNA plasmidial) y 5 U de Taq polimerasa (Promega). Esta mezcla se dividió en 4 tubos que contenían los cuatro desoxinucleótidos más uno de ellos como didesoxinucleótido. El PCR se llevó a cabo de la siguiente forma: 2 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturación), 30 s a 45 °C (hibridación) y 1 min a 70 °C (extensión). La mezcla de reacción se calentó a 70 °C por 2 min y se aplicó en un gel de acrilamida:bisacrilamida (19:1)-urea 8 M en tampón TBE (Tris-HCl 89 mM; H₃BO₃ 89 mM; Na₂EDTA 2 mM; pH 8,3). El gel se corrió a 60 W durante 2, 3 y 5 h y luego se procesó para autorradiografía.

En una segunda etapa de las investigaciones, se obtuvo la secuencia completa del fragmento de 500 pb, correspondiente al gen *aipI* de *S. typhi* (Figura 11), por métodos automáticos.

4.7.3. Obtención de DNA plasmidial

Los plasmidios pMA12 y pMA21, derivados del pBluescript KS II y el vector suicida pNM2, derivado del pGP704, se aislaron mediante Kits comerciales ConcertTM high purity midiplasmid DNA purification system (GibcoBRL) o WizardTM Plus minipreps plasmid DNA purification kit (Promega), según las recomendaciones del fabricante o mediante el protocolo descrito por Birnboim y Doly (1979). En este caso, se creció 10 ml de la cepa *E. coli* JM109/pBluescript KS II y 50 ml de la cepa *E. coli* DH5 α λ pir/pGP704 en caldo LB suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina, con agitación vigorosa a 37°C durante toda la noche. El cultivo se centrifugó 20 min a 3000 x g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; glucosa 50 mM; RNAsa 100 μ g/ml). Se dejó por 5 min a temperatura ambiente, se agregó 400 μ l de solución desnaturante preparada en el momento (NaOH 0,2 M; SDS 1 %), se mezcló suavemente y se dejó en hielo por 10 min. Se agregó 300 μ l de acetato de amonio 7,5 M, se dejó en hielo por 10 min, luego se centrifugó 20 min a 3000 x g. Se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril y se agregó un volumen de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó por 5 min a 13000 x g. Se rescató la fase acuosa (superior) en un tubo estéril y se repitió la extracción con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico

(24:1) hasta obtener una fase acuosa transparente. Entonces, se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M, se agitó por inversión y se dejó precipitando el DNA por 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 min a 13000 x g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 500 μ l de etanol 70 % frío, se centrifugó 5 min a 13000 x g, se eliminó el sobrenadante por aspiración y se secó por calor. El sedimento de DNA plasmidial, se resuspendió en un volumen apropiado de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C .

4.7.4. Obtención de DNA cromosomal

El DNA genómico de las bacterias se extrajo con mediante el kit WizardTM Genomic DNA purification system (Promega) o por el método de Ausubel y col., (1992). Brevemente, se creció 3 ml de la bacteria en caldo Luria, con agitación vigorosa a 37°C durante la noche. El cultivo se centrifugó 10 min a 3000 x g, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 570 μ l de tampón TE (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM). Se agregó 10 μ l de Proteinasa K (10 mg/ml), 5 μ l de RNAasa (10 mg/ml) y 30 μ l de SDS al 10 %. La mezcla se agitó por inversión suavemente y se incubó por 1 h a 37°C . Luego, se agregó 100 μ l de NaCl 5M, se agitó en vórtex y se agregó 80 μ l de CTAB 10 % en NaCl 0,7 M, se agitó nuevamente y se incubó a 65°C durante 10 min. Inmediatamente se agregó 1 volumen de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó 10 min a 13000 x g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril y se agregó un volumen de mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó por

10 min a 13000 x g. Se rescató la fase acuosa en un tubo limpio y se repitió la extracción hasta obtener una fase acuosa transparente. Enseguida se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol, se agitó por inversión y se dejó precipitando el DNA por 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 15 min a 13000 x g y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 500 µl de etanol 70 % frío, se centrifugó 5 min a 13000 x g y se secó por calor. El sedimento se resuspendió en un volumen apropiado de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C. La concentración de DNA se estimó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio por comparación con estándares de concentración conocida.

4.7.5. Electroporación

La cepa *E. coli* JM109 se electroporó con los plasmidios pMA12 y pMA21, respectivamente, ambos derivados de pBluescript KS II. La cepa *E. coli* DH5α (*λpir*) se electroporó con el plasmidio pNM2, la cual permite la replicación del plasmidio pGP704 y sus derivados. En el caso del DNA cromosomal, éste fue vigorosamente agitado en vórtex por 2 min antes de ser agregado a las células competentes. Se usó el método descrito por O'Callaghan y Charbit (1990), con algunas modificaciones, para electroporar cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium*. Las bacterias receptoras se crecieron en 75 ml de caldo LB hasta fase exponencial tardía a 0,5 OD₆₀₀, se enfriaron sobre hielo y se cosecharon por centrifugación a 3000 x g 10 min. Se lavó sucesivamente el sedimento bacteriano con 10, 5 y 2,5 ml de agua deionizada estéril fría. Finalmente, el pellet se resuspendió en 200 µl de agua deionizada estéril fría y se alicuotó en tubos Eppendorf

(50 μ l). Para la electroporación se añadió 1-5 μ l de DNA cromosomal (1-5 μ g) o 5 μ l de plasmidio (50-100 ng) a cada alícuota de bacterias competentes mantenidas en hielo. Se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación mantenida en hielo (abertura del electrodo 0,2 cm; BioRad). Se usó un pulso de 12,5 kV/cm (2,5 kV; 200 Ω ; 25 μ F) (Gene Pulser II, Bio-Rad) y se transfirió la mezcla rápidamente a un tubo de vidrio que contenía 1 ml de medio LB, el cual se incubó durante 1 h a 37°C con agitación antes de plaquear en el medio selectivo.

4.7.6. Ensayos de hibridación Southern blot y marcación de las sondas de DNA

4.7.6.1. Transferencia de DNA a membrana de nylon

El DNA fraccionado en gel de agarosa al 0,8 % se sumergió en una solución de HCl 2,5 N (despurinación) por 5 min, se cambió por solución fresca y se incubó 5 min adicionales. Se lavó con 10 volúmenes de agua y se transfirió a solución de desnaturación (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) por 20 min con agitación suave. Se reemplazó por solución fresca y se dejó 10 min adicionales. Nuevamente se lavó el gel con 10 volúmenes de agua y se agregó solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0; NaCl 3 M) por 20 min. Se cambió la solución hasta que el pH fue menor a 9.

En un recipiente con solución SSC 20x (citrate de sodio 0,3 M pH 7,4; NaCl 3 M) se puso una bandeja de plástico más pequeña, sobre la cual se extendió un trozo de papel Whatmann 3MM rectangular, cuyos extremos quedaron sumergidos en la solución. El papel se humedeció con SSC 20x y sobre él se puso el gel de agarosa que

contenía al DNA fraccionado. Enseguida se cubrió el gel con un trozo de membrana de nylon de igual tamaño, la cual previamente se hidrató por 10 min en agua, seguido de 5 min en 20x SSC. Entonces, se cubrió la membrana de nylon con 3 hojas de papel 3MM y sobre ellas varias capas de toallas de papel absorbentes, cortadas del mismo tamaño del gel. Finalmente, se depositó un vidrio plano sobre las toallas de papel y sobre éste se puso un peso de alrededor de 500 g. Se dejó transfiriendo el DNA por capilaridad durante 12 h, teniendo en cuenta el cambio de las toallas de papel y la evaporación de la solución de transferencia. Una vez concluido la transferencia, se retiró la membrana de nylon y se lavó en solución 2x SSC por 5 min. Se dejó secar bien al aire y se fijó el DNA a la membrana por irradiación con UV (254 nm) por 30 s.

4.7.6.2. Marcación radiactiva de la sonda *aipI*

La sonda que se utilizó para los experimentos de hibridación Southern fue el producto de amplificación de 500 pb obtenido por PCR, correspondiente al gen *aipI* de *S. typhi* Ty2. El fragmento de DNA se purificó con el kit ConcertTM Rapid PCR purification system (GibcoBRL), luego se fraccionó en geles de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y se extrajo desde el gel, siendo entonces purificado mediante el kit ConcertTM gel extraction system (GibcoBRL). Luego se procedió a marcar la sonda por PCR. La mezcla de reacción consistió de 100 ng de DNA, 30 pmoles de cada partidor, 125 μ M de deoxinucleósidos trifosfato en mezcla equimolar, que incluyó 200 μ Ci de [α -³²P]dATP 800 Ci/mmol (25 μ M final), 4 mM MgCl₂ y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Gibco) en 25 μ l de volumen de reacción. Las condiciones de amplificación fueron de:

94 °C por 5 min; 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, luego 72 °C por 10 min. El producto de amplificación radiactivo se purificó mediante el Qiaquick PCR purification kit (Qiagen).

4.7.6.3. Marcación no radiactiva de la sonda *aipI*

La sonda utilizada para los experimentos de hibridación Southern no radiactivo fue el producto de amplificación de 500 pb correspondiente al gen *aipI* obtenido por PCR a partir del cromosoma de *S. typhi* Ty2, el cual se purificó de la misma forma que en el punto. 4.7.6.2. Enseguida se realizó al marcaje de la sonda con el kit BioPrime DNA labeling system (GibcoBRL), según las instrucciones del fabricante. Se tomó 100 ng de sonda resuspendida en tampón de dilución (5-20 µl), se agregó 20 µl de solución random primer y se desnaturó por 5 min a 94 °C, inmediatamente se puso sobre hielo. Se adicionó 5 µl de la mezcla de nucleótidos, que incluye el nucleótido marcado (biotina-14-dCTP), se agregó 1 µl de fragmento de Klenow, se incubó 1 h a 37 °C, se adicionó 5 µl de stop buffer. Se purificó por último con el kit ConcertTM Rapid PCR purification system (GibcoBRL). Se almacenó a -20 °C hasta usar.

4.7.6.4. Hibridación Southern radiactivo

El DNA cromosomal de las cepas de *E. coli*, *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres o mutantes generadas, digeridos con *EcoRI*, se fraccionaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % mediante procedimientos estándar (Maloy, 1990), se transfirió a

membrana de nylon NENTM y se hibridó en condiciones de alta estrictez según Ausubel y col., (1992). Se utilizó como sonda la región 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2 marcada con [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP mediante PCR. La membrana de nylon se incubó con 0,2 ml/cm²membrana con solución de prehibridación (formamida 25 %; SSC 6x; Denhardt 5x; SDS 0,5 %; 100 $\mu\text{g/ml}$ DNA de espermio salmón fragmentado y desnaturado) a 42 °C por 2 h. Se reemplazó por solución de hibridación (formamida 25 %; SSC 6x; SDS 0,5 %; 100 $\mu\text{g/ml}$ DNA de espermio de salmón) precalentada a 42 °C. Inmediatamente se adicionó a ésta 100 a 200 ng de sonda marcada desnaturada a 100 °C por 5 min y luego enfriada sobre hielo. Se hibridó a 42 °C por 12 a 18 h y luego se procedió con los lavados. Primero se lavó con 10 volúmenes de 2x SSC; 0,1 % SDS a temperatura ambiente por 5 min. Luego con 0,2x SSC; 0,1 % SDS por 10 min a temperatura ambiente (baja estrictez) y por último dos lavados de 15 min con solución 0,1 % SSC; 0,1 % SDS, precalentada a 68 °C (alta estrictez). Se enjuagó en 2x SSC por 5 min, se dejó secar y se sometió a autoradiografía. Se expuso por 18 h sobre película XOMAT (Kodak).

4.7.6.5. Hibridación Southern no radiactivo

El DNA cromosomal de *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres y mutantes digeridos con *EcoRI* o con una combinación de enzimas *EcoRI/PstI/SfiI*, se fraccionó por electroforesis en geles de agarosa (Maloy, 1990) y se transfirió a membrana de nylon. Entonces se hibridó con la sonda *aipI* (500 pb) marcada con biotina. Para revelar se usó un sistema quimio-luminiscente, Photogene Detection System (Gibco BRL), según las

indicaciones del fabricante. Se usó además las soluciones de prehibridación-hibridación que recomienda el fabricante ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M pH 7,2; SDS 7 % y EDTA 1 mM) en condiciones de alta estrictez. Primero se incubó la membrana por 2 a 4 h con solución de pre-hibridación precalentada a 65 °C. Después, se procedió a incubar la membrana por 12 a 18 h a 65 °C con la solución de hibridación precalentada a 65 °C, la que incluyó 15 μl (0,5-1,0 μg) de la sonda marcada, la cual fue previamente desnaturalada a 100 °C por 5 min. Concluida la hibridación, se retiró la solución de hibridación y se lavó la membrana dos veces a 65 °C por 5 min en condiciones de alta estrictez con 2 ml/cm²membrana de solución SSC 5x; SDS 0,5 % precalentada a 65 °C. Después se lavó una vez a 50 °C por 35 min con solución SSC 0,1x; SDS 1 % precalentada a 50 °C y por último una vez por 5 min a temperatura ambiente con solución SSC 2x. Se reveló según las instrucciones del fabricante con el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina y se expuso entre 10 y 60 min sobre película XOMAT (Kodak).

4.7.7. Digestión del DNA cromosomal y plasmidial con enzimas de restricción

El DNA genómico o plasmidial se digirió siempre según las indicaciones del fabricante. En general, 1 μg DNA se digirió con 10 U de enzima de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *SfiI*, *PstI*, *XbaI*, *BglII*) a 37 °C entre 2-4 h. La digestión del DNA se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio.

4.7.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para fraccionar los fragmentos de DNA se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; acetato de sodio 20 mM). Los geles se corrieron a 10 V/cm. A las muestras se les agregó 1/5 del volumen de tampón de carga (glicerol 25 %; SDS 0,5 %; azul de bromofenol 0,025 %; EDTA 12 mM). Las bandas de DNA se observaron en transiluminador UV (254nm), tiñendo con 0,5-1 µg/ml de bromuro de etidio. Se fotografió con película Polaroid 677.

4.8. Ensayo de invasión en la línea celular epitelial humana HEP-2

Para determinar el índice de invasión y proliferación de las cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium* mutantes en la línea celular epitelial de origen humano HEP-2, se aplicó un ensayo *in vitro* basado en el método de Lissner y col., (1983). Este consiste en poner en contacto un cultivo bacteriano con una monocapa de células sembrada sobre una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc). Aproximadamente, $1-5 \times 10^6$ ufc (200 µl) de bacterias crecidas en anaerobiosis hasta fase exponencial temprana (0,15-0,20 OD₆₀₀), en condiciones que potencian el fenotipo invasor de la bacteria (Contreras y col., 1995b), se centrifugaron por 5 min a 12000 x g. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 ml de DMEMSF y se adicionó en alícuotas de 100 µl sobre 8 pocillos que contenían la monocapa de células HEP-2 confluyente (4×10^4 células/pocillo) a una moi de 10-50 bacterias por célula. Se incubó 1 h a 37 °C (atmósfera con 10 % CO₂), para.

permitir la entrada de las bacterias a las células. Enseguida se removió el medio y la monocapa celular se lavó dos veces con 100 μ l de PBS pH 7,4 suplementado con gentamicina (200 μ g/ml). Se adicionó 100 μ l de medio fresco suplementado con gentamicina (200 μ g/ml) y se continuó la incubación por 2 h más. Se lavó dos veces con PBS, para luego lisar las células de 4 pocillos con Triton X-100 al 1 % en PBS. El tratamiento por 10 min con este detergente no afecta la viabilidad de las bacterias silvestres y mutantes crecidas en aerobiosis y anaerobiosis, obteniéndose un porcentaje de recuperación de alrededor del 95% de las UFC totales agregadas, según se determinó en este estudio. El número de bacterias intracelulares (ufc a t_0) se determinó por recuento en placa sobre agar LB. Los 4 pocillos restantes se incubaron por 20 h más, para permitir la proliferación intracelular. Las monocapas celulares se lisaron y se determinó el número de bacterias intracelulares (ufc a t_{20}). Los resultados cuantitativos de los ensayos de invasión y proliferación se calcularon de la siguiente manera:

$$N_{t_0} = \text{ufc a } t_0 / \text{ufc agregadas}$$

$$\text{Indice de invasión} = 100 \times (N_{t_0})_{\text{mutante}} / (N_{t_0})_{\text{parental}}$$

$$\text{Indice proliferación} = 100 \times (\text{ufc a } t_{20} / \text{ufc a } t_0)_{\text{mutante}} / (\text{ufc a } t_{20} / \text{ufc a } t_0)_{\text{parental}}$$

4.9. Determinación de LD₅₀ en el modelo animal ratón

Se realizó determinaciones de LD₅₀ para evaluar el efecto de la mutación del gen *aipl* de *S. typhi* en ensayos de virulencia *in vivo*. Para ello se construyó una cepa de *S. typhimurium* patogénica con una mutación homóloga a de la mutante de *S. typhi*

(TYT2006), es decir, en el gen *adhE* utilizando el mismo vector suicida (pNM2). Se realizó dos experimentos independientes para la determinación de LD₅₀. En ambos casos se usó ratones BALB/C hembras de 7 a 8 semanas de edad, los cuales fueron inoculados vía oral (p. o.) con las bacterias crecidas en condiciones anaeróbicas, de la misma forma que para los ensayos *in vitro*. Antes de dar a beber el inóculo, el estómago de los ratones se neutralizó con 25 µl de bicarbonato de sodio 0,2 M. Los inóculos de *S. typhimurium* correspondientes a la cepa silvestre (14028s) y mutante (NPM1) se resuspendieron en PBS estéril, ajustando la concentración de bacterias para que en una alícuota de 100 µl, administrada directamente desde la punta de la pipeta, la dosis fuera de 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ y 10³ UFC, respectivamente. Se trabajó cada dilución bacteriana en grupos de 5 ratones. Además se incluyó el control, al cual se le administró sólo PBS. Se verificó diariamente el estado de los ratones, los sobrevivientes fueron sacrificados al cabo de 20 días, recuperándose de ambos grupos, bacterias desde hígado y bazo, donde la mutante (NPM1) aún conservó la resistencia a ampicilina, corroborándose así la estabilidad de la mutación. Se utilizó el método de Reed y Muench (1938) para determinar el 50% de la dosis letal de infección para la vía oral. Los experimentos con manipulación de animales, se realizaron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. U. C. de Chile.

4.10. Medición de la actividad alcohol deshidrogenasa de *S. typhi* y *S. typhimurium*

Se decidió determinar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa de *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* LT2, debido a que la proteína de 100 kDa, AipI, de *S. typhi*,

presentó similitud a la enzima AdhE de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se probó dos métodos diferentes. En ambos casos, los ensayos se basaron en los antecedentes de la literatura para la determinación de la actividad de la alcohol deshidrogenasa de *E. coli*.

En uno de los casos, se utilizó el método descrito por Clark y Cronan (1980). Se cultivó *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium* LT2 y *E. coli* K-12 en 200 ml de caldo LB en condiciones aeróbicas (200 rpm) a 37 °C y en 200 ml de caldo LB suplementado con glucosa al 1 % en anaerobiosis (sin agitación) hasta saturación (10^9 bacterias/ml). Se cosechó por centrifugación a 3000 x g por 10 min (rotor GSA), se lavó con solución 50 mM de tampón fosfato de potasio pH 7,4 y se resuspendió en 2,5 ml del mismo. Las bacterias se lisaron por sonicación (30 s con pulsos de 10) o mediante prensa French (150000-20000 lb/in²). Esto genera teóricamente de 16 a 24 mg de proteína totales/ml de bacteria procesados. La fracción sobrenadante cruda se obtuvo por ultracentrifugación a 27000 x g por 30 min en rotor Ti70 Beckman (Beckman L8-55M). La fracción de membranas se congeló a -70 °C. La fracción sobrenadante se volvió a ultracentrifugar a 145000 x g por 60 min, resultando la concentración de proteínas de esta fracción sobrenadante de alta velocidad de 1,5 a 4,5 mg de proteínas/ml, la cual se almacenó a -70 °C hasta la determinación enzimática de alcohol deshidrogenasa (ADH). La actividad ADH se analizó espectrofotométricamente (Beckman DU 640), midiendo la producción de NADH a 340 nm en el tiempo (cinética). Cada cubeta de reacción contenía: 5 µl de NAD⁺ (25 µg/ml); 20 µl de etanol 99 % o alilalcohol; 120 µl de tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 8,5; 2 µl de fracción soluble bacteriana de alta velocidad y 853 µl de agua. Se realizó las mediciones entre 0 y 5 min, a intervalos de 0,2 min. Se agregó 0,016 U de enzima (teóricamente contenida en el extracto crudo) para cada tubo de reacción, siendo

la concentración de cada muestra de sobrenadante de alta velocidad de alrededor de 9 U/ml. (1 U de enzima convierte 1 μ M de sustrato/min).

El segundo método que se utilizó consistió en un ensayo en placa Petri, descrito por Lorowitz y Clark (1982). Este utiliza el sustrato suicida alilalcohol, el cual permite aislar mutantes que carecen de alcohol deshidrogenasa, de modo que las bacterias que la expresan son selectivamente muertas. Primero, se ensayó la habilidad de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* para oxidar el etanol aeróbicamente usando placas indicadoras redox (tetrazolium; etanol 0,5%). La mutantes forman colonias blancas y las silvestres rojas. Enseguida, se ensayó la susceptibilidad a distintas concentraciones de alilalcohol, cultivando las placas a 37 °C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (jarra GasPack). Se tomó como referencia las sensibilidades límite reportadas por lo autores (Lorowitz y Clark, 1982) para *E. coli* silvestre: 200 mM alilalcohol para la bacteria crecida en aerobiosis y 50 mM en anaerobiosis. Por lo tanto, se probó varias concentraciones del sustrato suicida que fluctuaron entre 10 a 200 mM.

También se ensayó la capacidad para crecer en medio mínimo E suplementado con glucosa al 1 % en aerobiosis y anaerobiosis de las cepas silvestres y mutantes, dado a que se ha descrito que *E. coli* mutantes en ADH, son incapaces de desarrollarse en estas condiciones. Nuestros resultados demostraron que ambas mutantes, TYT2006 y NPM1, crecieron en las dos condiciones de cultivo, claro que el tiempo de duplicación fue menor.

4.11. Producción de antisuero anti proteína AipI de *S. typhi* Ty2

Se procedió a inocular dos conejos hembra adultos con un homogenizado de la proteína AipI, preparado de la siguiente manera. Se fraccionó entre 840-1050 μg de proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecida en condiciones de cultivo anaeróbico en gels al 12,5 % de poliacrilamida-SDS, teñidos con azul de Coomassie, recortándose las bandas correspondientes a la proteína de AipI (100 kDa) directamente desde el gel. Las bandas se molieron en partículas pequeñas pasando reiteradas veces la muestra por la aguja de una jeringa. Se utilizó PBS estéril para resuspender la muestra en 8 ml finales, que fueron inyectados por vía subcutánea en dosis de 4 ml en el lomo de cada conejo (Hudson y Hay, 1980).

Previo a la inmunización se extrajo desde la oreja de cada animal 5 ml de sangre, como control de suero preinmune. La segunda inmunización se realizó 15 días después de la primera, inyectando por la misma vía igual cantidad de antígeno, preparado según las indicaciones descritas. Transcurridas otras dos semanas se procedió a inmunizar por tercera y cuarta vez, con intervalos de 10 días entre cada inoculación. La última inyección se efectuó transcurridos 20 días más, bajo condiciones similares. En todas las ocasiones, se fue verificando la producción de anticuerpos anti AipI, mediante análisis Western blot (Hudson y Hay, 1980). Finalmente, se sacrificó ambos conejos por punción cardíaca a los 90 días de efectuada la primera inmunización. La sangre se dejó coagular por 1 h a 37°C, luego se incubó a 4 °C por 2 h, se removió el coágulo y se centrifugó a 1000 x g por 10 min. Se alicuotó y almacenó a -20 °C.

4.12. Análisis Western blot de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 con suero policlonal anti AipI

Las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecidas en aerobiosis y anaerobiosis, se extrajeron por el método de Lobos y Mora (1991) y se fraccionaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12, 5% (1-D), según lo indicado con anterioridad. Concurrida la electroforesis el gel se sumergió en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20 %) por algunos segundos. En forma paralela, se humedeció la membrana de nitrocelulosa (NC). Entoces se montó el sistema de electrotransferencia, según Towbin y Godpon (1979), tomando la precaución de manipular todo el material con guantes y pinzas. La transferencia de proteínas de la ME se llevó a cabo por 3 h entre 120 a 150 mA a voltaje constante. Concluida esta etapa, se lavó la membrana con tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 200 mM) y luego se bloqueó con TBS-BSA 1 % por 30 min a temperatura ambiente, con agitación suave. Enseguida se incubó por 30 min a temperatura ambiente con el suero de conejo anti AipI diluido 1:1000 en tampón TBS-BSA 1 %. Luego se lavó tres veces por 5 min con solución TBS-0,5 % Tween 20 y se incubó con anti IgG de conejo conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1:5000 en TBS-BSA 1 % por 1 h a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con TBS-0,5 % Tween 20 y se sumergió en solución amortiguadora de sustrato (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM) por 3 min. Enseguida se reveló con 0,16 mg/ml de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolilfosfato, sal de p-toluidina) más 0,33 mg/ml de NBT (azul de nitrotetrazolio) en amortiguador de sustrato. La reacción se detuvo con agua-EDTA.

4.13. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta con bacteria vivas

Se cultivó *S. typhi* Ty2 silvestre y la mutante *S. typhi aipI* (TYT2006) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, según las condiciones establecidas. Se tomó 1,5 ml de cada cultivo crecido hasta 0,4 OD₆₀₀ y se centrifugó a 12000 x g por 5 min. Se lavó el pellet 3 veces con PBS estéril y se procedió a incubar con el suero del conejo 1 diluído 1:500 en PBS. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó el pellet 3 veces con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo, anti IgG de conejo conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) diluída 1:50 en PBS, por 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Entonces, se lavó el pellet bacteriano 3 veces con PBS y se resuspendió en 100 µl del tampón. Se tomó 10 µl de la muestra de bacterias, se mezcló con 10 µl de medio de montaje y se observó en microscopio de epifluorescencia (Nikon) con luz UV.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2

Las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 cultivada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas se aislaron por tres métodos diferentes, con el objeto de comprobar la efectividad de los métodos de extracción y escoger el más adecuado para las siguientes investigaciones. Además se analizó en algunos casos la fracción de MI para identificar la presencia de posibles proteínas contaminantes en la ME.

5.1.1. Aislamiento de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 cultivada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas

Los resultados correspondientes a los métodos de extracción ensayados, se muestran en la Figura 5. Aquí se señala las preparaciones de ME obtenidas de *S. typhi* crecidas en aerobiosis (carriles 2, 4 y 6) y anaerobiosis (carriles 3, 5 y 7), por el método de Schnaitman modificado por Lobos y Mora (1991), el de Michiels y col., (1990) y el del Sarkosyl (Nikaido, 1994). Las flechas amarillas (en 3 y 5) indican las proteínas inducidas en anaerobiosis, comparadas con su contra parte en aerobiosis (2 y 4). Claramente, la utilización del detergente aniónico Sarkosyl (carriles 6 y 7), favorece la extracción de las porinas (Nikaido, 1994). Debido a que nos interesó enfocar los estudios en las "otras" proteínas de la ME, de las cuales se sabe muy poco, es que este método de

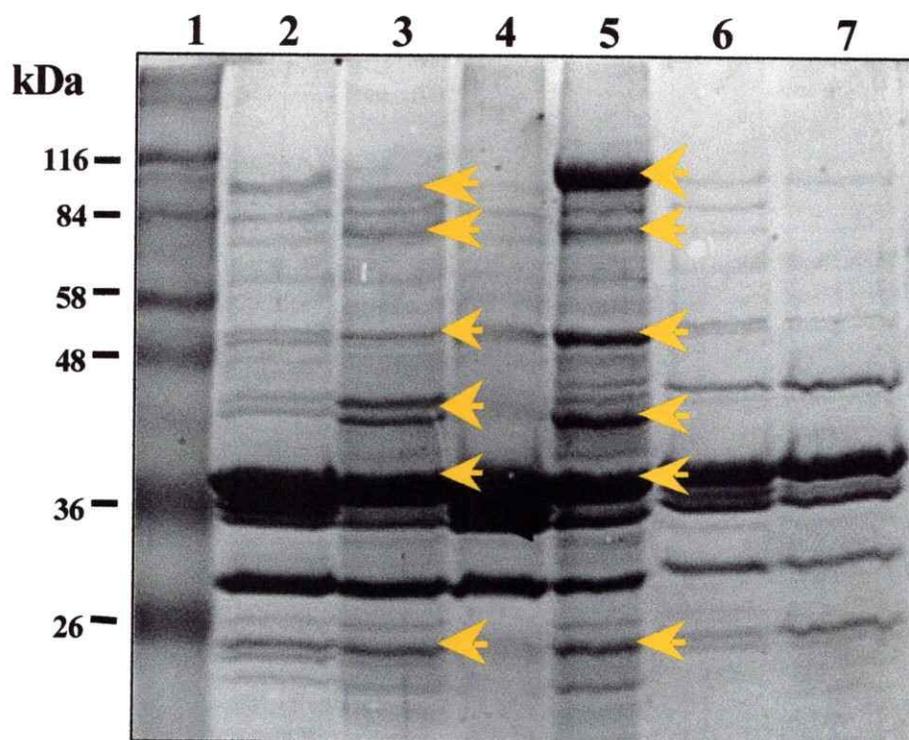


Figura 5. Análisis de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecidas en aerobiosis y anaerobiosis. Se aisló las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 mediante tres métodos diferentes de extracción. Se muestra en (1) el estándar de tamaño molecular. Las proteínas de la ME aisladas por el método de Lobos y Mora (1991) en aerobiosis (carril 2) y anaerobiosis (carril 3); por el de Michiels y col., (1990) en aerobiosis (carril 4) y anaerobiosis (carril 5) y por un método que usa un detergente alternativo (Nikaido, 1994), como el Sarcosyl, en aerobiosis (carril 6) y anaerobiosis (carril 7). Las flechas amarillas indican las proteínas mayormente inducidas por la condición de cultivo anaeróbico (3 y 5), correspondientes con un tamaño molecular de 100, 80, 50, 46, 44, 36 y 20 kDa, respectivamente.

extracción fue descartado inmediatamente. En los otros dos métodos probados, los perfiles de proteínas analizados en geles unidimensionales fueron similares, observándose en ambos, las mismas de proteínas de la ME inducidas en anaerobiosis. Finalmente, se escogió trabajar los experimentos siguientes, con el método de Lobos y Mora (1991), ya que éste no requiere de ultracentrifugación, una ventaja en el tiempo y sencillez del procedimiento, respecto al de Michiels, y col., (1990).

En la Figura 6 se muestra uno de los perfiles de proteínas obtenidos de *S. typhi* Ty2, cultivadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, aisladas mediante el método de Michiels y col., (1990). Se muestran las proteínas de la ME extraídas en condiciones aeróbicas (carril 3) y se las compara con el perfil de proteínas obtenido cuando la bacteria es crecida en anaerobiosis (carril 4). Las flechas azules indican las proteínas de la ME mayormente inducidas por la condición ambiental anóxica, las cuales corresponden a las bandas observadas en la región de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa. La porina OmpA, se usó como estándar interno de la cantidad de proteínas cargada, para así poder determinar la inducción de alguna proteínas. OmpA es constitutiva y por lo tanto, no estaría sometida a procesos de regulación (Calva y Puente, 1995). Además, se muestran las proteínas de la MI, extraídas en condiciones de crecimiento aeróbico (carril 5) y anaeróbico (carril 6). En este caso, las flechas rojas indican la ausencia de ciertas proteínas en la fracción de MI, pero que sí se observaron inducidas en la ME de bacterias crecidas en anaerobiosis, descartando la posibilidad de que las proteínas que se observan en la fracción de ME sean contaminantes de membrana citoplasmática. También se muestra la fracción de proteínas de bacterias totales crecidas en aerobiosis

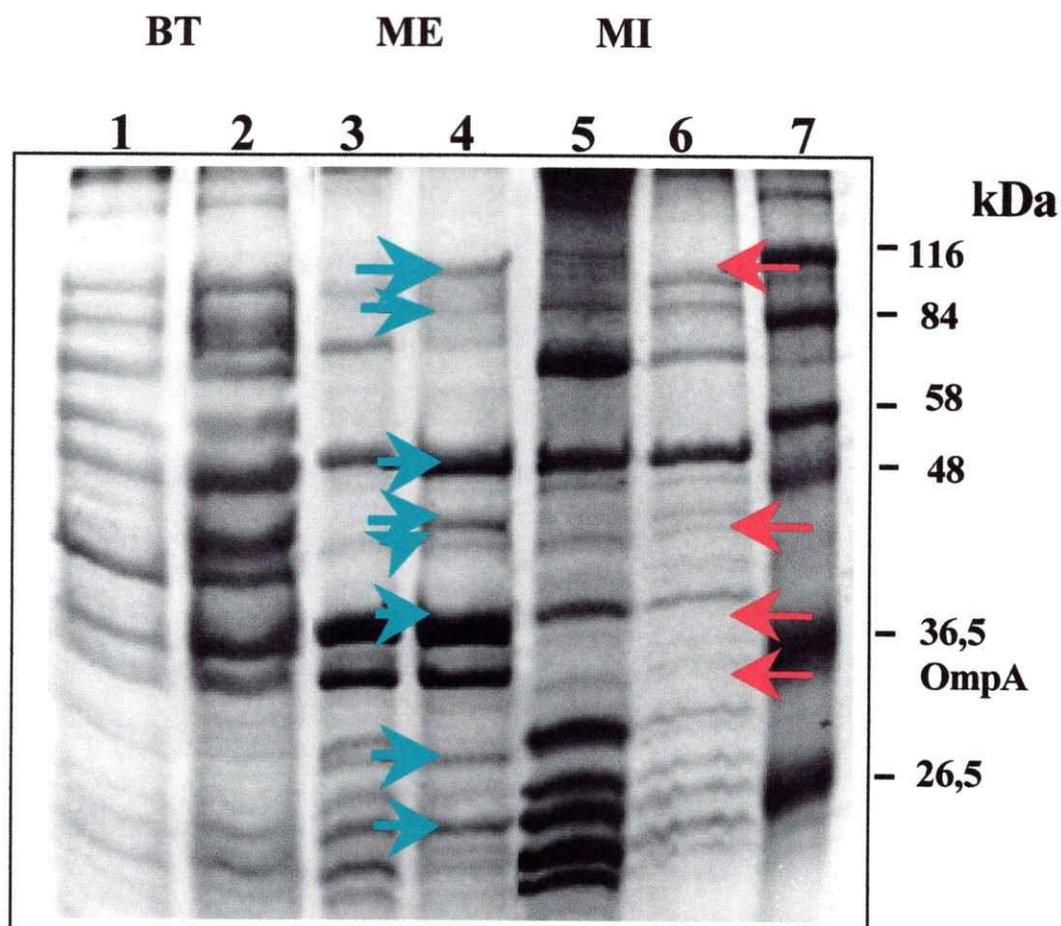


Figura 6. Análisis de las fracciones subcelulares de *S. typhi* Ty2 crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. Se aisló las proteínas de la fracciones de ME (3 y 4), MI (5 y 6) y bacterias totales (1 y 2) de *S. typhi* Ty2 crecida en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, mediante el método de Michiels y col., (1990). Se fraccionó en geles al 12,5 % de poliacrilamida-SDS y se tiñó con azul de Coomassie. Las flechas azules indican las proteínas de la ME mayormente inducidas en anaerobiosis (carril 4), correspondientes a un tamaño molecular de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa, respectivamente. Las flechas rojas indican la ausencia de estas proteínas de la ME en la fracción de MI (carril 6). En (7), el estándar de tamaño molecular 7B.

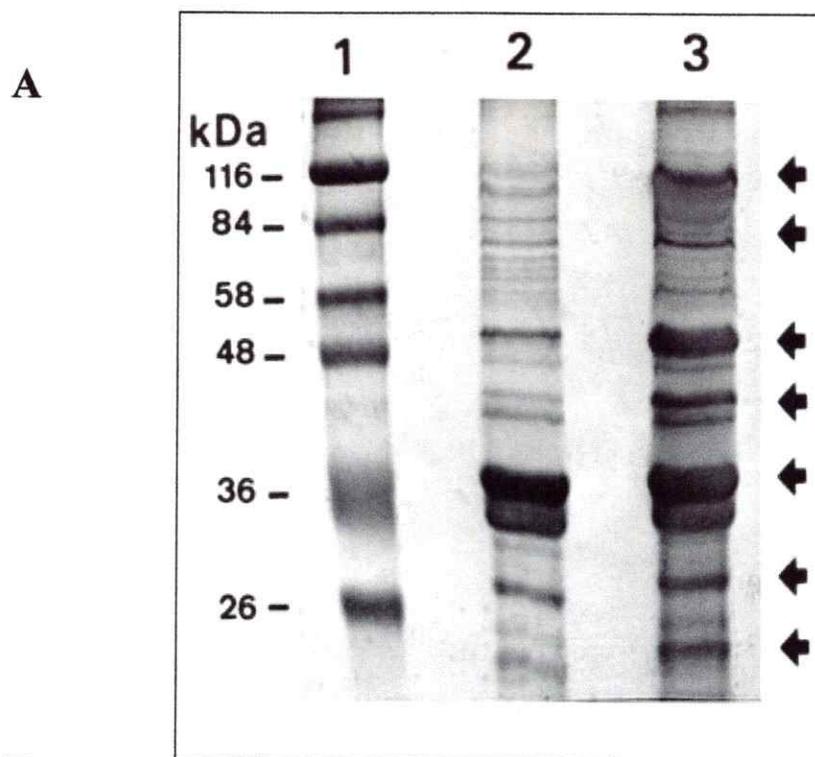
(carril 1) y anaerobiosis (2) también se muestran, junto al estandar de tamaño molecular (carril 7).

5.1.2. Selección de las proteínas de la ME de *S. typhi* mayormente inducidas en anaerobiosis mediante análisis densitométrico

Se fraccionó las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecidas en aerobiosis y anaerobiosis en geles al 12,5% de poliacrilamida-SDS, se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se sometió a análisis densitométrico mediante programa computacional para análisis de imagen, NIH-Image. La Figura 7 muestra uno de los densitogramas (panel B) obtenidos para las muestras de proteínas de la ME extraídas por el método de Lobos y Mora (1991) (panel A). Las flechas negras indican las proteínas mayormente inducidas por la condición ambiental anóxica, las que correspondieron a un tamaño molecular de alrededor de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa, respectivamente.

5.1.3. Marcación de las proteínas de superficie de *S. typhi* Ty2 crecida en aerobiosis y anaerobiosis con el reactivo NHS-biotina

Con el objeto de corroborar que las proteínas de la membrana externa de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis efectivamente se encuentran en la superficie de la bacteria y que corresponden al perfil obtenido de éstas mediante tinción con azul de Coomassie, se decidió marcar las proteínas de la envoltura de *S. typhi* Ty2 mediante biotilación *in vivo*. El reactivo reactivo NHS conjugado a compuestos biotilados (Figura 1) ha sido



B

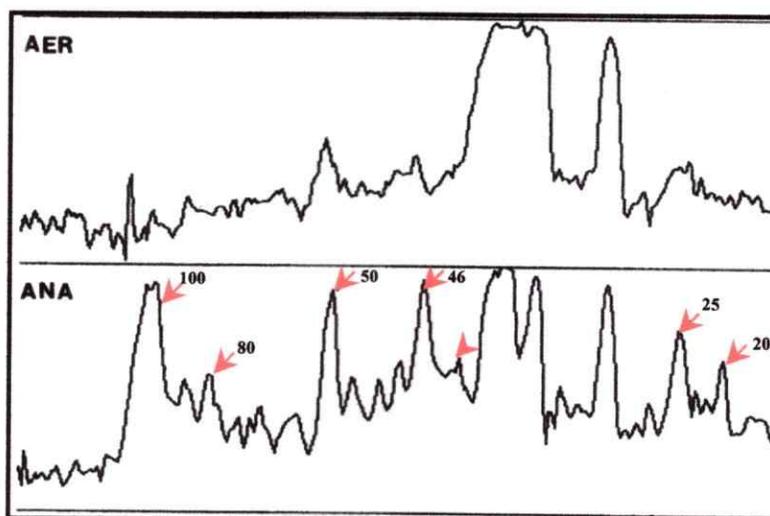


Figura 7: Proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y densitometría. A: Las proteínas de la ME de *S typhi* Ty2 crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico, se aislaron por el método de Lobos y Mora (1991), se fraccionaron en geles al 12,5 % de poliacrilamida-SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. Las flechas negras indican las proteínas mayormente inducidas en anaerobiosis (carril 3), correspondientes con una masa molecular aparente de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa, respectivamente. Se muestra al lado el perfil de proteínas de la ME de bacterias crecidas en aerobiosis (carril 2) y el estándar de tamaño molecular 7B (carril 1). B: Análisis densitométrico de los perfiles de proteínas mostrados en (2) y (3), para la determinación de las proteínas inducidas en anaerobiosis (flechas rojas).

utilizado para marcar proteínas de superficie de células eucariontes, hongos y bacterias Gram negativas (Bradburne y col., 1993). Estos autores ensayaron específicamente la capacidad del reactivo NHS-biotina para marcar selectivamente proteínas de la envoltura de *E. coli in vivo*, demostrando que marcaba preferencialmente proteínas de la ME, periplasma y MI, pero nunca marcadores citosólicos. En base a estas investigaciones y al trabajo realizado por Burchard y Bloodgood (1990) para identificar proteínas de la superficie de la bacteria *Cytophaga* spp. involucradas en la adhesión a sustratos, se diseñó como marcar las proteínas de superficie de *S. typhi* Ty2 crecidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. De esta manera se comparó los perfiles de proteínas “marcadas” con los de las proteínas teñidas. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos para *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* LT2. En esta ocasión se introdujo el control *S. typhimurium*, debido a la gran cantidad de reportes que se encuentra en la literatura acerca de las proteínas de la ME de esta bacteria. Cabe destacar, que con estos experimentos no estamos evaluando la inducción de una u otra proteína, ya que no se ha demostrado que la incorporación de biotina a las proteínas de superficie sea cuantitativa. Por lo tanto, la biotinilación de las proteínas de la ME de *S. typhi* o *S. typhimurium* sólo ocurre si éstas están expuestas en la superficie de la bacteria.

Los perfiles de proteínas biotinizadas obtenidos para *S. typhi* Ty2, tanto en aerobiosis (carril 1) como anaerobiosis (carril 2), se relacionan bastante bien con los perfiles de proteínas obtenidos por tinción con azul de Coomassie, desde el punto de vista del tamaño molecular y migración electroforética. Lo mismo se pudo determinar para las proteínas de *S. typhimurium* aisladas en aerobiosis (carril 3) y anaerobiosis (carril 4). El análisis de esta información sugiere fuertemente, que las proteínas que

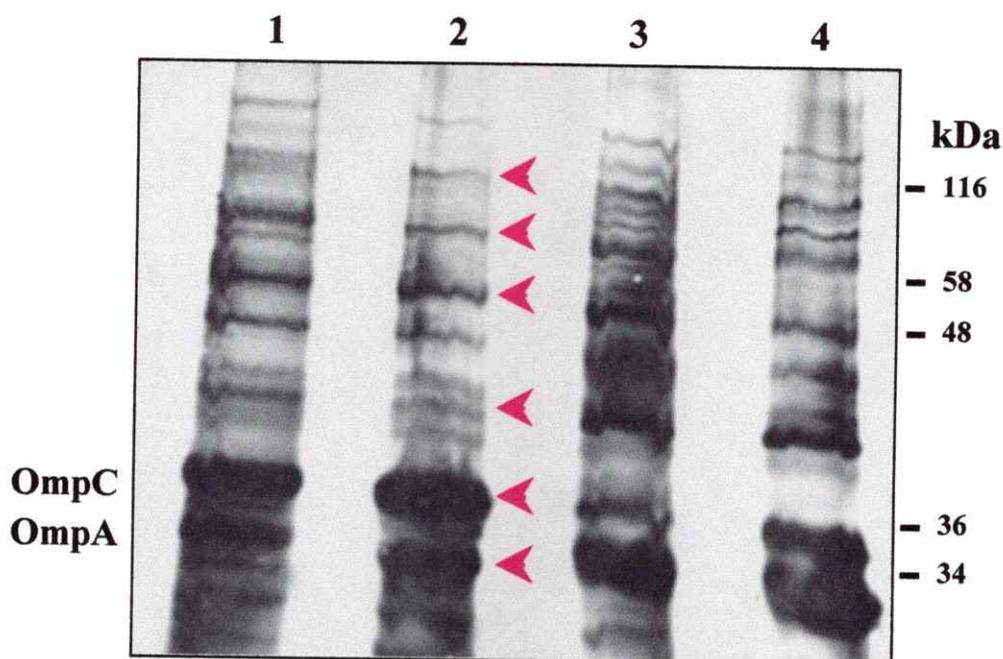


Figura 8. Proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 marcadas con NHS-biotina. Se creció las bacterias en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico, las cuales se cosecharon y marcaron *in vivo* con el reactivo NHS-biotina. Entonces, se extrajo las proteínas de la ME por el método de Lobos y Mora (1991), las cuales se fraccionaron en geles al 12, 5 % de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, donde la presencia de biotina se reveló con estreptavidina conjugada a peroxidasa, mediante tratamiento con el sustrato diaminobencidina (DAB) más peróxido de hidrógeno. Se muestra el perfil de proteínas biotilado obtenido para *S. typhi* Ty2 crecida en aerobiosis (carril 1) y anaerobiosis (carril 2), donde las flechas indican las proteínas de la ME de 100, 80, 50, 46, 36 y 34 kDa. También se muestra la marcación obtenida para la cepa *S. typhimurium* LT2 cultivada en aerobiosis (carril 3) y anaerobiosis (carril 4).

observamos en nuestras preparaciones de ME pertenecen a esa fracción. También podría tratarse de proteínas en vías de secreción.

5.1.4. Análisis de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 en geles bidimensionales

En una primera aproximación experimental se montó la técnica de electroforesis bidimensional para comparar los perfiles de proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 silvestre. Se introdujo el detergente zwitteriónico CHAPS en las preparaciones, el cual mantiene las proteínas de membrana en una forma no desnaturalada y evita la agregación artefactual de éstas, lo que permite mayor reproducibilidad en la etapa del IEF. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos para *S. typhi* cultivada en aerobiosis (panel A) y anaerobiosis (panel B). En el recuadro 1 se indica una de las proteínas inducidas en anaerobiosis. No obstante, también se observó la represión de algunas por esta condición ambiental (recuadro 2). Los datos encontrados en la literatura para el proteoma de *S. typhimurium* (O' Connor y col., 1997) sugirieron la ubicación de las siguientes proteínas: flagelina (n° 1), porina OmpA (n° 2) y AipI (anaerobically induced protein I) (n° 3), la cual se induce bajo la condición ambiental anóxica, según nuestros estudios. La proteína de 100 kDa, resultó con similitud a la AdhE (alcohol deshidrogenasa) de *S. typhimurium*, antecedente, entre otros que discutiré más adelante, la transformó en el eje central de nuestras investigaciones. Uno de nuestros objetivos fue entonces lograr mutar el gen *aipI* mediante inserción del vector suicida pNM2 (genética reversa). El detalle de la estrategia, resultados obtenidos, así como el análisis de las proteínas de la ME en geles

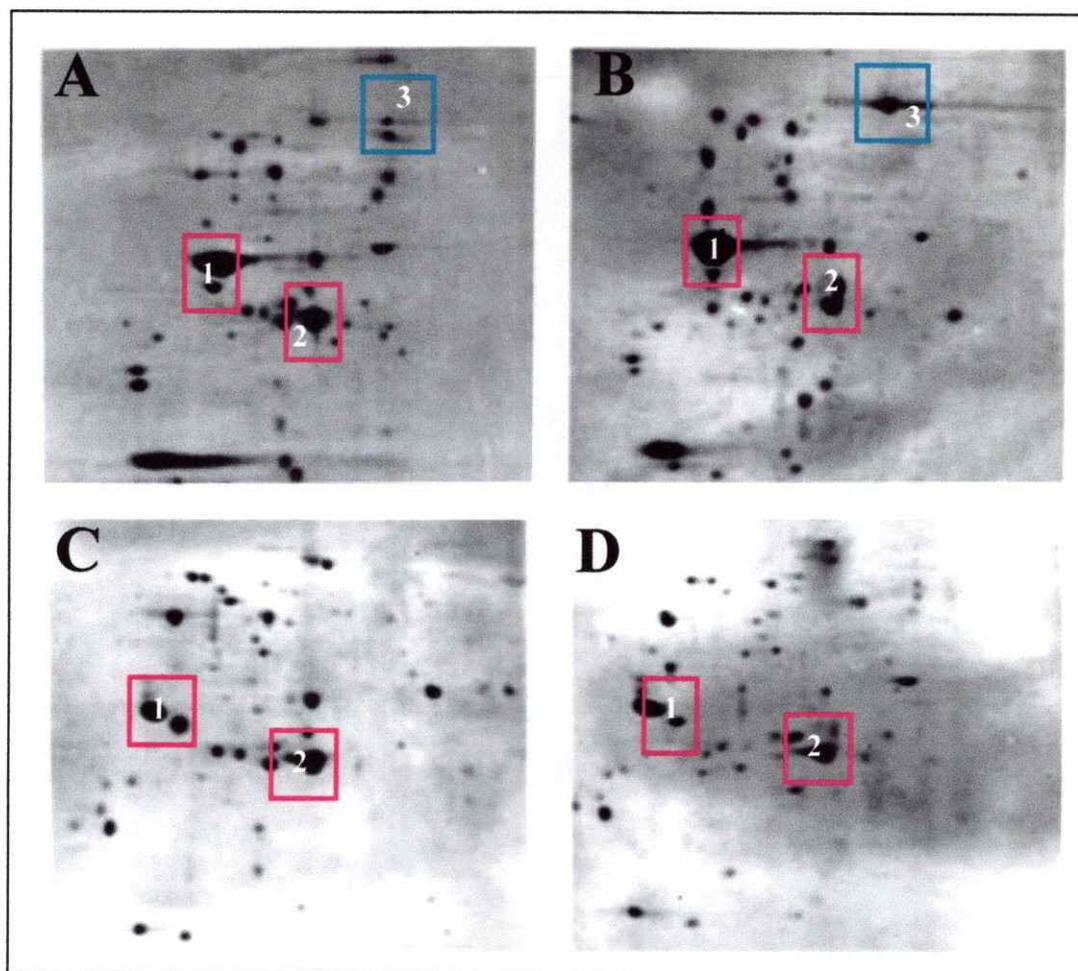


Figura 9. Electroforesis bidimensional de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y mutante *S. typhi* TYT2006. Se aisló las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y mutante *S. typhi* TYT2006 crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico mediante el método descrito por Lobos y Mora (1991). Entoces se sometió las proteínas a electroforesis bidimensional, según O' Farrell (1975) modificado por Hochstrasser y col., (1988). En los paneles superiores se muestra las proteínas de *S. typhi* Ty2 extraídas en condiciones de cultivo aeróbico (A) y anaeróbico (B). En C y D, las proteínas de la ME de la mutante TYT2006, aisladas en aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente. Se destaca la posición de flagelina (1), OmpA (2) y AipI (3).

bidimensionales de la mutante generada (TYT2006) (Figura 9; paneles C y D) se describirán posteriormente.

5.2. Identificación de las proteínas de la ME de *S. typhi* inducidas en anaerobiosis

Después de haber analizado los perfiles de proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 cultivada en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, se determinó la clara inducción de al menos siete proteínas en anaerobiosis. De ellas se seleccionó las proteínas de 100, 80, 50, 46, 44 y 20 kDa para ser sometidas a secuenciación N-terminal. Las secuencias N-terminales de las proteínas se analizaron luego en los bancos de datos disponibles mediante BlastP. La banda de 36 kDa corresponde a la porina OmpC (*S. typhi*), la cual previamente había sido informada por nuestro grupo como inducida por la baja disponibilidad de oxígeno (Contreras y col., 1995a).

5.2.1. Obtención de las secuencias de amino ácidos N-terminales y análisis en el programa BlastP

En la Tabla 3, se encuentran resumidas las secuencias de aminoácidos obtenidas y las similitudes encontradas en el banco de datos NCBI por el programa BlastP.

De las seis proteínas transferidas a membrana de PVDF, se obtuvo la secuencia de aminoácidos N-terminal de cinco de ellas, correspondientes a las bandas de 100, 50, 46, 44 y 20 kDa, las cuales se denominaron Aip (anaerobically induced protein) I, II, III, IV y V, respectivamente. De la proteína de 80 kDa no se obtuvo secuencia, por lo que se

Tabla 3. Secuencias N-terminales de las proteínas de *S. typhi* Ty2 inducidas en anaerobiosis y sus similitudes según el programa Basic BlastP

<u>Banda de Proteína</u>	<u>Secuencias N-terminales, similitud* y número de acceso en NCBI</u>
AipI 100 kDa⁺	1 AVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAXA 38
<u>U68173</u>	Alcohol deshidrogenasa AdhE de <i>S. typhimurium</i> . I: 97%; P: 97%; L: 878
	2 AVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAA 39
<u>P17547</u>	Alcohol deshidrogenasa AdhE de <i>E. coli</i> . I: 97%; P: 97%; L: 891
	2 AVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAA 39
<u>156357</u>	Espirosina de <i>E. coli</i>
<u>156356</u>	Espirosina de <i>Y. enterocolitica</i>
AipII 50 kDa	1 AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQXALGTAI 28
<u>L21912</u>	Flagelina de <i>S. typhi</i> . I: 97%; P: 97%; L: 506
	2 AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAI 29
<u>V01370</u>	Flagelina H-1 de <i>S. typhimurium</i>
AipIII 46 kDa	1 MDFHGVATEGIQLRG 15
	1 VDFHGYAREGIQWTG 15
<u>X54292</u>	Mall Maltoporina de <i>S. typhimurium</i> . I: 86%; P: 86%; L: 452
	26 VDFHGYARSGIGWTG 40
<u>sp/P02943</u>	LamB Maltoporina de <i>E. coli</i>
AipIV 44kDa	1 AEIYNKDGNKLDLFG 15
<u>S01248</u>	OmpC porina de <i>S. typhi</i> . I: 100%, P: 100%; L: 378
	22 AEIYNKDGNKLDLFG 36
<u>P37432</u>	OmpF porina de <i>S. typhimurium</i>
<u>X89756</u>	OmpS2 de <i>S. typhi</i>
<u>X89757</u>	OmpS3 de <i>S. typhi</i>
<u>Q56119</u>	PhoE precursor de <i>S. typhi</i> . I: 73%; P: 99%; L: 350
	21 AEVYNKNGNKLDVYG 35
<u>P30705</u>	PhoE de <i>S. typhimurium</i> .
AipV 20kDa	1 AVIKNKDINKAXLFE 15
	No presentó similitudes

* Similitudes listadas en base a L (número de aminoácidos) y a sus porcentajes de I (identities) y P (positives). + GenBank, número de acceso para AipI: AF145591.

sospecha de un extremo N-terminal bloqueado. Todas las secuencias se analizaron en el programa BlastP de NCBI (modo de búsqueda: nr) con el objeto de pesquisar secuencias homólogas en los bancos de datos disponibles y así poder identificarlas. Las secuencias aminoacídicas de cuatro de ellas (AipI, II, III y IV) presentaron similitud con proteínas presentes en estos bancos de datos y como era de esperarse, las mayores semejanzas se presentaron con proteínas de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se obtuvo entre 10 a 38 aminoácidos de secuencia N-terminal mayoritaria, excepto en el caso de la proteína de 46 kDa, donde se informó dos secuencias posibles, de acuerdo al rendimiento en pmoles de cada aminoácido.

La secuencia de aminoácidos generada a partir de la banda de proteína de 100 kDa (1AVTNVAELNALVERVKKKAQREYASFTQEVDKIFRAXA38) mostró 100 % de identidad con la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli* (sp/P17547) y AdhE de *S. typhimurium* (gi/1519723). La proteína AdhE de *E. coli* ha sido extensivamente estudiada. Es una enzima trifuncional con actividades de alcohol deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y piruvato formato liasa desactivasa. La transcripción de *adhE* es inducida en anaerobiosis y reprimida, tanto por oxígeno como por nitrato (Leonardo y col., 1993). El gen *adhE* mapea en el centisoma 27,5 de *E. coli* y 38 de *S. typhimurium* (Sanderson y col., 1995).

La secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína de 50 kDa, AipII, (1AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQXALGTAI28), presentó similitud con la flagelina de *S. typhi* y *S. typhimurium* con una identidad de 97%.

La proteína de 46 kDa mostró dos secuencias de aminoácidos N-terminales mayoritarias, (1MDFHGVATEGIQLRG15) y (1VDFHGYAREGIQWT14) cuya

combinación de secuencia se denominó proteína AipIII (1VDFHGYARSGIGWTG15), la cual presentó un 86 % de identidad con las porinas MalL (X54292) de *S. typhimurium* y LamB (P02943) de *E. coli*. Ambos genes, *malL* y *lamB* son parte del operón maltosa, forman homotrímeros (porinas) específicos para la captación y catabolismo de maltodextrinas. También, pueden actuar como poros pequeños de difusión para iones y sustratos hidrofílicos (Meyer y col., 1997).

La secuencia N-terminal de AipIV (1AEIYNKDGKLDLFG15), correspondiente a la proteína de 44 kDa, mostró un 100 % de similitud con la secuencia con la porina OmpC (sp/S01248) entre otra serie de porinas como OmpF de *S. typhimurium* (sp/P37432), OmpS2 (X89756) y OmpS3 (X89757) de *S. typhi* y un 86% de identidad con la porina PhoE de *S. typhi* (Q56119) y *S. typhimurium* (sp/P30705).

Por último, la secuencia amino terminal de la proteína más pequeña (1AVIKNKDINKAXLFE15), denominada AipV (20 kDa), no presentó similitud con ninguna proteína procarionte presente en los bancos de datos disponibles en NCBI (modo de búsqueda: nr), analizada por el programa BlastP, sugiriendo que AipV de *S. typhi* es una proteína hasta hoy no conocida.

5.3. Mutagénesis del gen *aipI* mediante la estrategia experimental de genética reversa

Una vez secuenciados los extremos N-terminales de las proteínas de *S. typhi* Ty2 mayormente inducidas en anaerobiosis, se debía escoger la proteína a mutagenizar con el fin de evaluar su rol en el proceso de invasión a células epiteliales humanas en cultivo.

Esta elección resultó relativamente obvia, debido principalmente a la curiosidad que despertó, en cuanto a su localización y abundancia, la proteína de 100 kDa, AipI, con similitud a la alcohol deshidrogenasa AdhE de *S. typhimurium* y *E. coli*. La ubicación de AipI en la ME de *S. typhi* y la gran cantidad en que se encuentra, posiblemente tiene que ver con la función que podría tener esta proteína-enzima, quizá un rol estructural en la ME.

Para mutagenizar el gen *aipI* de *S. typhi* Ty2, se optó por la estrategia experimental conocida como genética reversa. Ello implica el previo conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína blanco, lo cual nos permite inferir la secuencia nucleotídica codificante y así diseñar el método más adecuado para dirigir la inserción hacia el gen de interés. En nuestro caso, se escogió inactivar el gen *aipI* mediante mutagenización por inserción del vector suicida pNM2, derivado del pGP704. Para ello, se clonó en el plasmidio pGP704 el fragmento 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2 obtenido por PCR, generando el derivado pNM2, el cual se utilizó para todos los experimentos de inactivación génica (Figura 4). Previo a la mutagénesis se realizó controles, que incluyeron la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR (pág. 82) y el análisis Southern blot (Figura 21) para verificar la existencia de una sola copia del gen blanco en el cromosoma de *S. typhi*.

El PCR se diseñó en base a la información obtenida a partir de la secuencia N-terminal de la proteína AipI (100 kDa), la cual mostró un 100 % de similitud con la región N-terminal de la alcohol deshidrogenasa AdhE de *S. typhimurium* y *E. coli*. Entonces, se tomó la secuencia del gen *adhE* de *S. typhimurium* (U68173) presente en GenBank y se diseñó una pareja de partidores para amplificar por PCR la región 5' del

gen *aipI* desde el cromosoma de *S. typhi* Ty2. Tal estrategia involucra suponer la alta identidad de secuencia nucleotídica descrita entre especies del género *Salmonella*.

5.3.1. Amplificación de los genes *aipI* de *S. typhi* y *adhE* de *S. typhimurium* por PCR

Se amplificó por PCR la región 5' de los genes *aipI* de *S. typhi* Ty2 y *adhE* de *S. typhimurium* LT2. Se introdujo como controles de amplificación los DNAs cromosomales de *E. coli* K-12, *S. typhimurium* 14028s y *S. typhimurium* MS1. En todos los casos, se obtuvo una sola banda de DNA como producto de amplificación, de alrededor de 500 pb, similar al tamaño teórico esperado para *S. typhimurium* (490 pb). Los resultados del PCR se muestran en la Figura 10, donde los carriles 1 y 2 muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del cromosoma de *S. typhimurium* LT2 y *S. typhi* Ty2, respectivamente, los cuales fueron después clonados en el vector pBluescript KS para su secuenciación. Los carriles 3, 4 y 5 muestran los productos de amplificación obtenidos a partir de los cromosomas de *S. typhimurium* 14028s, *E. coli* K-12 y *S. typhimurium* MS1, respectivamente.

5.3.2. Secuenciación de la región 5' de los genes *aipI* de *S. typhi* Ty2 y *adhE* de *S. typhimurium* LT2

Con el objeto de verificar la identidad de los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA cromosomal de *S. typhi* y *S. typhimurium*, éstos se clonaron en el vector pBluescript KS II, generando los plasmidios denominados pMA21 y

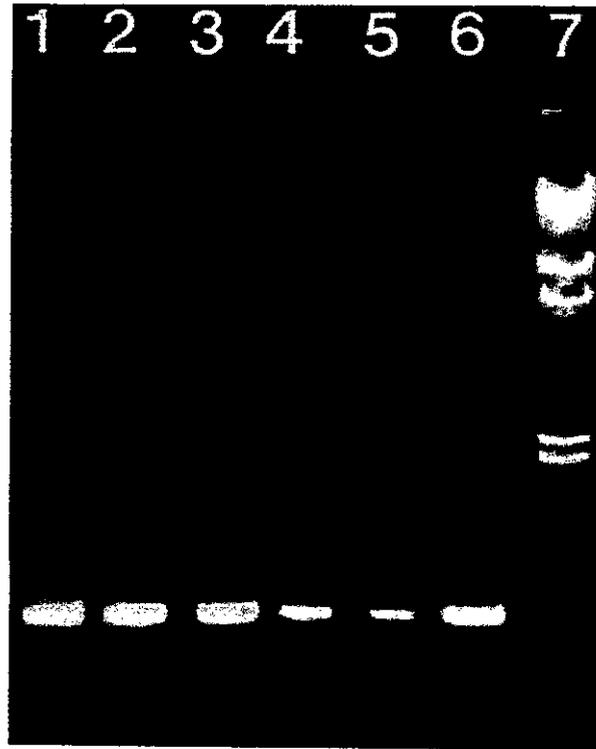


Figura 10. Productos de amplificación obtenidos por PCR usando DNAs cromosomales de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* como templado. Se purificó los DNAs cromosomales de las bacterias, los cuales fueron utilizados como templado para la reacción de PCR, según las condiciones establecidas en este estudio (métodos, pto. 4.7.1.). Se muestra el producto de amplificación obtenido a partir de *S. typhimurium* LT2 (1), *S. typhi* Ty2 (2), *S. typhimurium* 14028s (3), *E. coli* K-12 (4) y *S. typhimurium* MS1 (5). Se muestra además, el producto de amplificación purificado, obtenido desde el cromosoma de *S. typhimurium* LT2 (6), y el estándar de tamaño molecular, DNA del fago Lambda/*Hind*III (7).

pMA12 (Figura 4), respectivamente. Entonces, se secuenció alrededor de 80 pb de cada uno de los insertos clonados. Las secuencias de DNA obtenidas fueron:

Secuencia inserto pMA12 (DNA de *S. typhimurium*):

5' ACGCTGATAGCTGAGCCGTACGCATCTCTCTCGATCGCGCGCTAAAGAAGCAACTAA
CAAAGCGGCAGACATCGTTCTGCAAGCGCTACGCTGCCGG3'

Secuencia inserto pMA21 (DNA de *S. typhi*)*:

5' TAAAGCACTACAACGGAGAATCGTTTCGAGCGCTATCGCTGCCGGCGACCGAAAGAT
CTGATTGGCTGGATCGATCAACCTTCCGGTAGAACTGTCTTACGTACTA3'

*Nº de acceso a GenBank: AF145591

El análisis de las secuencias descritas en el programa BlastN de NCBI, nos indicó que correspondían a los fragmentos génicos que deseábamos obtener, ya que presentaron identidad (90%) de secuencia con el gen *adhE* de *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, lo que nos permitió seguir con el siguiente paso: el análisis Southern blot y la posterior mutagénesis del gen *aipI* de *S. typhi*.

En forma paralela, se decidió secuenciar el fragmento completo del gen *aipI* clonado en el plasmidio pMA21. La secuencia de DNA obtenida se envió al banco de datos GenBank, donde se le asignó el número de acceso: AF145591. La secuencia nucleotídica obtenida a partir de este inserto de alrededor de 500 pb se muestra en la Figura 11.

5' GCCAGTTTCACTCAAGAACAGGTCGACAAAATCTTCCGCGCCGCGCTCTGGCAGCC
GCTGATGCCCGCATTCGCTGGCCAAAATGGCCGTCGCCGAATCAGGTATGGGTATCGT
GGAAGACAAAGTGATTAAAAACCACTTCGCTTCTGAATATATTTACAATGCCTATAAAG
ATGAAAAACCTGCGGCGTGCTGTCAGAAGACGACACCTTCGGGACCATCACCATTGCT
GAACCTATCGGCATTATTTGCGGTATCGTTCCAACCACTAACCCGACCTCTACTGCGAT
CTTCAAATCGCTGATTAGCCTGAAGACCCGTAACGCCATCATCTTTTCTCCGCATCCGC
GCGCTAAAGAAGCAACTAACAAAGCGGCAGACATCGTTCTGCAGGCGGCTATCGCTGCC
GGCGCACCGAAAGATCTGATTGGCTGGATCGATCAACCTTCCGGTAGAACTGTCTTACG
T3'

*Número de acceso a GenBank: AF145591.

Figura 11. Secuencia nucleotídica del fragmento 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2*. Se muestra la secuencia de DNA obtenida a partir del fragmento 5' del gen *aipI*, de alrededor de 500 pb, clonado en el plasmidio pMA21. La secuencia de DNA se obtuvo mediante métodos automáticos.

5.3.3. Análisis de las secuencias nucleotídicas mediante el programa BlastN en NIH-NCBI y Sanger Centre

Las secuencias de DNA obtenidas desde los insertos clonados en el vector pMA12 (*adhE*) y pMA21 (*aipI*) (pto. 5.3.2) se analizaron en los bancos de datos disponibles en NIH-NCBI. Ambas secuencias mostraron identidad con los genes *adhE* de *S. typhimurium* y *adhE* de *E. coli*. Gracias a la nueva disponibilidad de bancos de datos (1999), orientados específicamente al genoma de *S. typhi*, se pudo mejorar el análisis de las secuencias de los insertos contenidos en los clones pMA12 y pMA21, las cuales se corrieron en el banco de datos disponibles en Sanger Centre. Ambas, presentaron alineamiento con el mismo clon, contig 348 de alrededor de 1500 pb. Más tarde, este banco de datos se fue completando. En la actualidad, contiene la secuencia completa del genoma de *S. typhi*, ordenada en clones contiguos, por lo que resultó de gran apoyo para el análisis de nuestra secuencia de alrededor de 500 pb, correspondiente al fragmento 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2. La secuencia *aipI* se analizó con el programa BlastN de Sanger Centre, demostrando estar completamente contenida ahora en el clon contig 352 de 374565 pb, presentando un 99 % de identidad de secuencia nucleotídica (Figura 12). El análisis río arriba y río abajo de la secuencia alineada por BlastN, permitió identificar el gen putativo completo dentro del contig 352. Se identificó el sitio de inicio de la traducción, codón ATG (AUG), apoyados en la secuencia de aminoácidos N-terminal de AipI y el codón de término TAA (UAA). El ORF completo comprende 2679 pb (Figura 13), el cual codificaría la proteína AipI de 893 aminoácidos (Figura 14). Entonces, se realizó el alineamiento por el método de Clustal W entre los

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Smallest Sum
Contig352	High Probability Score P(N) N
	2308 1.7e-99 1
 >Contig352 [Full Sequence]	
Length = 374,565	
Minus Strand HSPs:	
Score = 2308 (346.3 bits), Expect = 1.7e-99, P = 1.7e-99	
Identities = 466/470 (99%), Positives = 466/470 (99%), Strand = Minus / Plus	
 Query: 471 CGTAAGACAGTTCTACCGGAAGGTTGATCGATCCAGCCAATCAGATCTTTCCGGTGCGCCG 412	
C T AGACAGTTCTAC GGAAGGTTGATCGATCCAGCCAATCAGATCTTTCCGGTGCGCCG	
Sbjct: 65861 CATTAGACAGTTCTAC-GGAAGGTTGATCGATCCAGCCAATCAGATCTTTCCGGTGCGCCG 65919	
 Query: 411 GCAGCGATAGCCGCCTGCAGAACGATGTCTGCCGCTTTGTTAGTTGCTTCTTTAGCGCGC 352	
GCAGCGATAGCCGC TGCAGAACGATGTCTGCCGCTTTGTTAGTTGCTTCTTTAGCGCGC	
Sbjct: 65920 GCAGCGATAGCCGCTTGCAGAACGATGTCTGCCGCTTTGTTAGTTGCTTCTTTAGCGCGC 65979	
 Query: 351 GGATGCCGAGAAAAGATGATGGCGTTACGGGTCTTCAGGCTAATCAGCGATTTGAAGATC 292	
GGATGCCGAGAAAAGATGATGGCGTTACGGGTCTTCAGGCTAATCAGCGATTTGAAGATC	
Sbjct: 65980 GGATGCCGAGAAAAGATGATGGCGTTACGGGTCTTCAGGCTAATCAGCGATTTGAAGATC 66039	
 Query: 291 GCAGTAGAGGTCGGGTTAGTGGTTGGAACGATACCGCAAATAATGCCGATAGGTTCCAGCA 232	
GCAGTAGAGGTCGGGTTAGTGGTTGGAACGATACCGCAAATAATGCCGATAGGTTCCAGCA	
Sbjct: 66040 GCAGTAGAGGTCGGGTTAGTGGTTGGAACGATACCGCAAATAATGCCGATAGGTTCCAGCA 66099	
 Query: 231 ATGGTGATGGTCCCGAAGGTGTCGTCTTCTGACAGCAGCCCGCAGGTTTTTTCATCTTTA 172	
ATGGTGATGGTCCCGAAGGTGTCGTCTTCTGACAGCAGCCCGCAGGTTTTTTCATCTTTA	
Sbjct: 66100 ATGGTGATGGTCCCGAAGGTGTCGTCTTCTGACAGCAGCCCGCAGGTTTTTTCATCTTTA 66159	
 Query: 171 TAGGCATTGTAAATATATTCAGAAGCGAAGTGGTTTTTAATCACTTTGTCTCCACGATA 112	
TAGGCATTGTAAATATATTCAGAAGCGAAGTGGTTTTTAATCACTTTGTCTCCACGATA	
Sbjct: 66160 TAGGCATTGTAAATATATTCAGAAGCGAAGTGGTTTTTAATCACTTTGTCTCCACGATA 66219	
 Query: 111 CCCATACCTGATTCGGCGACGGCCATTTTGGCCAGCGGAATGCGGGCATCAGCGGCTGCC 52	
CCCATACCTGATTCGGCGACGGCCATTTTGGCCAGCGGAATGCGGGCATCAGCGGCTGCC	
Sbjct: 66220 CCCATACCTGATTCGGCGACGGCCATTTTGGCCAGCGGAATGCGGGCATCAGCGGCTGCC 66279	
 Query: 51 AGAGCGGCGCGCGGAAGATTTTGTGACCTGTTCTTGAGTGAAACTGGC 2	
AGAGCGGCGCGCGGAAGATTTTGTGACCTGTTCTTGAGTGAAACTGGC	
Sbjct: 66280 AGAGCGGCGCGCGGAAGATTTTGTGACCTGTTCTTGAGTGAAACTGGC 66329	

Figura 12. Análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento génico *aipI* de *S. typhi* mediante el programa BlastN en Sanger Centre. Se muestra el resultado del alineamiento de la secuencia de DNA obtenida para el fragmento 5' del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2 (clonado en pMA21) dentro del contig 352 en Sanger Centre.

ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAGGCGCCAGCGTGAATATGCCAGTTTCAC
 TCAAGAACAGGTGCAAAAATCTTCGCGCCGCGCGCTCTGGCAGCCGCTGATGCCCGCATTCCGCTGGCCAAAATGGCCG
 TCGCCGAATCAGGTATGGGTATCGTGGAAGACAAAGTGATTAATAAACCACTTCGCTTCTGAATATATTTACAATGCCTAT
 AAAGATGAAAAAACCCTGGCGGTGTGTGTCAGAAGACGACACCTTCGGGACCATCACCATTGCTGAACCTATCGGCATTAT
 TTGCGGTATCGTTCCAACCACTAACCCGACCTCTACTGCGATCTTCAAATCGCTGATTAGCCTGAAGACCCGTAACGCCA
 TCATCTTTTCTCCGCATCCGCGCGCTAAAGAAGCAACTAACAAAAGCGGCAGACATCGTTCTGCAAGCGGTATCGCTGCC
 GCGCACCGAAAGATCTGATGGCTGGATCGATCAACCTTCCGTAGAACTGTCTAATGCGGTGATGCACCACCCGGATAT
 TAACCTGATCCTCGCCACTGGCGGTCCAGGCATGGTTAAAGCTGCATACAGCTCCGGTAAACCGGCAATCGGCGTAGGCC
 CAGGTAACACCCCGTTGTCTATTGATGAAACCGCTGATATCAAACCGCTGTGGCGTCTGTTCTGATGTCTAAAACCTTC
 GATAACGGCGTAATCTGTGCTTCTGAACAGTCTGTTGTGCTGTTGATTCCGCTCTATGATGCCGTTCCGGAACGTTTCG
 CAGCCACGGCGGTACATGCTGCAGGGCCAGGAGCTGAAAGCGGTTCAAACGTTATTCTGAAAAATGGCGCTCTGAACG
 CCGCTATCGTCGGTCAGCCAGCCTACAAAATCGCTGAACTGGCAGGCTTCTCCGTACCAGAAACCACCAAGATTCTGATC
 GGTGAAGTTACGGTCTTGACGAAAGCGAACCGTTCCGCACAGAAAACCTGCTCCGACTCTAGCGATGTACCCTGCGAA
 AGATTTGGAAGAAGCGGTAGAAAAAGCAGAAAACTGGTCGCTATGGGCGGTATCGGTCACACCTCCTGCCTGTACACTG
 ACCAGGATAACCAGCCAGAACCGGTTGCTTACTTCGGTCAGATGATGAAAACCGCGGTATCCTGATCAACACCCCGGCC
 TCTCAGGGTGGTATCGGTGACCTGTACAACTTCAAACCTCGCACCTTCCCTGACGTTGGGTTGTTGTTCTTGGGTTGGTAA
 CTCCATCTCTGAAAACGTTGGTCCGAAACACCTGATCAACAAGAAAACCGTTGCTAAGCGAGCTGAANNATGTNGTGGC
 ACAAACTTCCGANATCTATCTACTTCCGCGTGGCTCTCTGCCCATCGCGCTGGATGAAGTGATTACTGATGGCCACAAA
 CGTGCGCTCATCGTGACTGACCCTTCTGTNCAACAACGGCTATGCAGACCAGATCACCTCTGTGCTGAAAGCGGCTGG
 CGTTGAAACCGAAGTCTTCTTCGAAGTTGAAGCAGACCCGACGCTTCCGTTGTTTCGCAAAGCGCTGAGCTGGCTAACT
 CCTTCAAACCGGACGTGATCATCGCGCTGGGCGGCGGTTCCCGATGGACGCCGCGAAAATCATGTGGGTCATGTACGAA
 CATCCGAAACTCACTTCGAAGAACTGGCGCTGCGCTTTATGGACATCCGTAAACGTATCTACAAGTTCCCGAAAATGGG
 CGTGAAAGCGAAAATGATCGCCGTCACCACCACTTCCGGTACCAGTTCTGAAGTCACACCGTTTGGCGTTGTGACCGACA
 ATGCAACCGGTGAGAAATATCCGCTGGCTGACTATGCCCTGACCCCGGATATGGCGATTGTCGATGCCAACCTGGTGATG
 GATATGCCGAAGTCCCTGTGTGCTTCCGGTCTGGATGCGGTAACCTCACGCCCTGGAAGCTTACGTNTCCGTACTGGC
 TTCTGAGTTCTCTGACGGTTCAGGCTCTGCAGGCTCTGAACTGCTGAAAGAAAACCTGCCGGCGTCTTACCACGAAGGT
 CTAAAAACCCGGTTGCGCGTGAACGTGTTTACAGTGCAGCGACTATCGCCGGTATCGCGTTTGCCAACGCCCTTCTCGGT
 GTATGTCACTCCATGGCGCACAACTGGGCTCTCAGTTCACATTCGCGACGGTCTGGCGAACGCCCTGCTGATTTGTAA
 CGTTATCCGCTACAACGGAATGACAACCCGACCAAGCAGACCGCTTTCAGCCAGTACGATCGTCCGAGGCACGCCGTC
 GTTACGCTGAAATTGCTGACCACCTGGGCTGAGCGCGCCGGCGACCGTACCGCCGCTAAGATTGAAAACTGCTGGCA
 TGGCTGGAAGCATTAAAGCTGAGCTGGGCATTCTAAGTCTATACGTGAAGCAGGCGTGCAGGAAGCTGACTTCTTGGC
 ACACGTTGACAACTGTCTGAAGATGCCTTCGATGACCAGTGCACCGCGCTAACCCGCGTTATCCGCTGATCTCCGAAC
 TGAACAGATTTCTGCTGGATACCTACTACGCTCGTATTTACCAGGTTGAAGTTGCAGCGAAGAAAGACGCTCGTTGCC
 GCACCGAAAGCAGAGAAAAAGCGAAAAATCCGCTTAA

Figura 13. Secuencia nucleotídica putativa del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2. Se muestra el ORF putativo para el gen *aipI* de *S. typhi* Ty2, completado a partir del alineamiento del fragmento 5' del gen *aipI* con el contig 352 en sanger Centre. En azul se muestra la secuencia de DNA contenida en el contig 352 río arriba y río abajo del alineamiento con nuestra secuencia "desconocida" (500 pb), indicada en rojo. En verde, el codón ATG, inicio de la traducción y en fucsia, el codón de término, TAA, constituyendo un orf de 2679 nt, que originaría una proteína de 893 aminoácidos.

MAVTNVAELNALVERVKAQREYASFTQEQVDKIFRAAALAAADARIPLAKMAVAESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNAY
 KDEKTCGVLSEDDTFGTITIAEPIGIICGIVPTTNPTSTAIFKSLISLKTRNAIIFSPHPRAKEATNKAADIVLQAAIAA
 GAPKDLIGWIDQPSVELSNALMHHPDINLILATGGPGMVKAAYSSGKPAIGVGAGNTPVVIDETADIKRAVASVLMKSTF
 DNGVICASEQSVVVVDSVYDAVRERFASHGGYMLQGQELKAVQNVILKNGALNAAIVGQPAYKIAELAGFSVPETTKILI
 GEVTVVDESEPFHAHEKLSPTLAMYRAKDFEEAVEKAEKLVAMGGIGHTSCLYTDQDNQPERVAYFGQMMKTARILINTPA
 SQGGIGDLYNFKLAPSLTLGCGSWGGSISENVGPKHLINKKTVAKRAEXMXWHKLPXSIYFRRGSLPIALDEVITDGHK
 RALIVTDRFLXNNGYADQITSVLKAAGVETEVEFFVEADPTLSVVRKGAELANSFKPDVITIALGGGSPMDAAKIMWVME
 HPETHFEELALRFMDIRKRIYKFKMGVKAKMIAVTTTSGTGSEVTPFAVVTDNATGQKYPLADYALTPDMAIVDANLVM
 DMPKSLCAFGGLDAVTHALEAYVSVLASEFSDGQALQALKLLKENLPASYHEGSKNPVARERVHSAATAGIAFANAFLG
 VCHSMAHKLGSQFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRPQARRRYAEIADHLGLSAPGDRTAAKIEKLLA
 WLESIKAELGIPKSIREAGVQEADFLAHVDKLSEDAFFDDQCTGANPRYPLISELKQILLDTYYGRDFTEGEVAAKKDVA
 APKAEKKAKKSA.

Figura 14. Secuencia aminoacídica de la proteína AipI de *S. typhi* Ty2. Se muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína AipI (893 aa) de *S. typhi*, deducida a partir de la secuencia del gen *aipI* (Fig. 13). En rojo se indica la secuencia N-terminal obtenida inicialmente (Tabla 3) y en azul, la secuencia deducida.

genes genes *adhE* de *E. coli*, *adhE* de *S. typhimurium* y la secuencia del gen *aipI* de *S. typhi*, cuyo resultado se muestran en la Figura 15.

Por otro lado, la traducción del gen *aipI* (2679 pb) en el programa DNA Strider y Edit Seq, genera una proteína de 893 aminoácidos, que al ser analizada en el programa BlastP de NCBI (Altschul y col., 1997), indicó la más alta similitud con la AdhE de *E. coli* (P17547) (88 %) y *S. typhimurium* (U68173) (65 %), seguidas de la AdhE de *Clostridium acetobutylicum* (P33744) (66 %) y AdhE de *Giardia intestinalis* (U93353) (66 %). La similitud de secuencia de aminoácidos comprende mayoritariamente la región N-terminal de éstas. No obstante, la tendencia apreciada muestra que hacia la región C-terminal de cada proteína, la identidad de secuencia de aminoácidos disminuye. En la Figura 16 se muestra el resultado del alineamiento por el método de Clustal W de las proteínas AdhE de *E. coli*, AdhE de *S. typhimurium* y AipI de *S. typhi*. En detalle estos resultados muestran similitud de secuencia entre las proteínas AipI de *S. typhi* y AdhE de *E. coli*. Por el contrario, AipI presenta similitud con AdhE de *S. typhimurium* sólo desde el aminoácido 1 al 153, donde se pierde la identidad hasta el aminoácido 300, volviéndose a recuperar desde el 301 hasta el residuo 493, a partir de donde aparecen dominios de divergencia dentro de la región C-terminal. Por lo tanto, las proteínas AipI de *S. typhi* Ty2, AdhE de *S. typhimurium* y AdhE de *E. coli* presentan la mayor similitud de secuencia en sus regiones N-terminales (aminoácido 1 al 150), lo que estaría indicando posiblemente la conservación de este dominio funcional en estas tres especies bacterianas.

La proteína AipI traducida, también se analizó en el programa PredictProtein (Maxhom multiple sequence alignment), el cual indicó similitudes con la AdhE de *E.*

Majority ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAAAAAGCCAGCGTGAAATATGCCAGTTTCAC
10 20 30 40 50 60 70 80

adHE Ecoli ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAAAAAGCCAGCGTGAAATATGCCAGTTTCAC 80
aipITy2 ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAAAAAGCCAGCGTGAAATATGCCAGTTTCAC 80
adHE Stymi ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAAAAAGCCAGCGTGAAATATGCCAGTTTCAC 80

Majority TC AAGAACAGGTCGACA AAATC TTCCGCGCCGCTCTGGCTGCCGCTGATGCCGATTCCGCTGCCAAAATGGCCG
90 100 110 120 130 140 150 160

adHE Ecoli TC AAGAACAGGTCGACA AAATC TTCCGCGCCGCTCTGGCTGCCGCTGATGCCGATTCCGCTGCCAAAATGGCCG 160
aipITy2 TC AAGAACAGGTCGACA AAATC TTCCGCGCCGCTCTGGCTGCCGCTGATGCCGATTCCGCTGCCAAAATGGCCG 160
adHE Stymi TC AAGAACAGGTCGACA AAATC TTCCGCGCCGCTCTGGCTGCCGCTGATGCCGATTCCGCTGCCAAAATGGCCG 160

Majority TC GC CGAATCCGGTATGGTATCGTGG AAGAC AAAGTGA TTA AAAC CACTTCGCTTCTGAATATATTTACAACGCCAT
170 180 190 200 210 220 230 240

adHE Ecoli TTGCGAATCCGGTATGGTATCGTGG AAGAC AAAGTGA TTA AAAC CACTTCGCTTCTGAATATATTTACAACGCCAT 240
aipITy2 TTGCGAATCCGGTATGGTATCGTGG AAGAC AAAGTGA TTA AAAC CACTTCGCTTCTGAATATATTTACAACGCCAT 240
adHE Stymi TTGCGAATCCGGTATGGTATCGTGG AAGAC AAAGTGA TTA AAAC CACTTCGCTTCTGAATATATTTACAACGCCAT 240

Majority AAAGATGAAAAACCTGCGCGCTGCTGTC TGAAGACGAC ACC TTCGGGACCATC ACC ATTCG TG AAC CTATCGCATTAT
250 260 270 280 290 300 310 320

adHE Ecoli AAAGATGAAAAACCTGCGCGCTGCTGTC TGAAGACGAC ACC TTCGGGACCATC ACC ATTCG TG AAC CTATCGCATTAT 320
aipITy2 AAAGATGAAAAACCTGCGCGCTGCTGTC TGAAGACGAC ACC TTCGGGACCATC ACC ATTCG TG AAC CTATCGCATTAT 320
adHE Stymi AAAGATGAAAAACCTGCGCGCTGCTGTC TGAAGACGAC ACC TTCGGGACCATC ACC ATTCG TG AAC CTATCGCATTAT 320

Majority TTGCGGTATCGTTC CAACC ACTAACCCGACCTCTACTGC GATCTTCAAATCGCTGATAGCC TG AAG ACCGTAACGCCA
330 340 350 360 370 380 390 400

adHE Ecoli TTGCGGTATCGTTC CAACC ACTAACCCGACCTCTACTGC GATCTTCAAATCGCTGATAGCC TG AAG ACCGTAACGCCA 400
aipITy2 TTGCGGTATCGTTC CAACC ACTAACCCGACCTCTACTGC GATCTTCAAATCGCTGATAGCC TG AAG ACCGTAACGCCA 400
adHE Stymi TTGCGGTATCGTTC CAACC ACTAACCCGACCTCTACTGC GATCTTCAAATCGCTGATAGCC TG AAG ACCGTAACGCCA 400

Majority TC ATCTTTTCTCGCATCCGCGCGCTA AAGAAGC AAC CAACAAGCGGC AGACA TCG TTCTGCAGGC XGCTATC GTCTGCC
410 420 430 440 450 460 470 480

adHE Ecoli TFATCTTTCTCGCATCCGCGCGCTA AAGAAGC AAC CAACAAGCGGC AGACA TCG TTCTGCAGGC XGCTATC GTCTGCC 480
aipITy2 TC ATCTTTTCTCGCATCCGCGCGCTA AAGAAGC AAC CAACAAGCGGC AGACA TCG TTCTGCAGGC XGCTATC GTCTGCC 480
adHE Stymi TC ATCTTTTCTCGCATCCGCGCGCTA AAGAAGC AAC CAACAAGCGGC AGACA TCG TTCTGCAGGC XGCTATC GTCTGCC 479

Majority GGCGCXC GAAAGATCTGATGCTGG ATCGATC AACCTCCG -TAGAATGTC TAACGXC TG ATGCACCACCCGGATA
490 500 510 520 530 540 550 560

adHE Ecoli GGCGCXC GAAAGATCTGATGCTGG ATCGATC AACCTCCG -TAGAATGTC TAACGXC TG ATGCACCACCCGGATA 559
aipITy2 GGCGCXC GAAAGATCTGATGCTGG ATCGATC AACCTCCG -TAGAATGTC TAACGXC TG ATGCACCACCCGGATA 559
adHE Stymi GGCGCXC GAAAGATCTGATGCTGG ATCGATC AACCTCCG -TAGAATGTC TAACGXC TG ATGCACCACCCGGATA 557

Majority TXAACCTGATCC TCGCC AC TGGCGGTC CAGGC ATGGTTA AAGCTGCATACAGCTCCGGTAAACC XGCTATCGCGGTAGGC
570 580 590 600 610 620 630 640

adHE Ecoli TXAACCTGATCC TCGCC AC TGGCGGTC CAGGC ATGGTTA AAGCTGCATACAGCTCCGGTAAACC XGCTATCGCGGTAGGC 639
aipITy2 TXAACCTGATCC TCGCC AC TGGCGGTC CAGGC ATGGTTA AAGCTGCATACAGCTCCGGTAAACC XGCTATCGCGGTAGGC 639
adHE Stymi TXAACCTGATCC TCGCC AC TGGCGGTC CAGGC ATGGTTA AAGCTGCATACAGCTCCGGTAAACC XGCTATCGCGGTAGGC 632

Majority GCAGCAACACTCCGGTGT TTA TTGATGA AACCGCTGATA ---TCAAACGC -GC A -G TG GCXTC TGTXC TGATG TCTAAA
650 660 670 680 690 700 710 720

adHE Ecoli GCAGCAACACTCCGGTGT TTA TTGATGA AACCGCTGATA ---TCAAACGC -GC A -G TG GCXTC TGTXC TGATG TCTAAA 714
aipITy2 GCAGCAACACTCCGGTGT TTA TTGATGA AACCGCTGATA ---TCAAACGC -GC A -G TG GCXTC TGTXC TGATG TCTAAA 714
adHE Stymi GCAGCAACACTCCGGTGT TTA TTGATGA AACCGCTGATA ---TCAAACGC -GC A -G TG GCXTC TGTXC TGATG TCTAAA 712

Majority	CGCCCTGCTGATTTGTAACGTTATTCGCTACAACGCGAACGACAACCAGCCAGCAGAGCTGCATTCAGCCAGTATGACC								
	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	
adhE Ecoli	CGCCCTGCTGATTTGTAACGTTATTCGCTACAACGCGAACGACAACCAGCCAGCAGAGCTGCATTCAGCCAGTATGACC								2302
aiP1Ty2	CGCCCTGCTGATTTGTAACGTTATTCGCTACAACGCGAACGACAACCAGCCAGCAGAGCTGCATTCAGCCAGTATGACC								2302
adhE Stymi	CGCCAGGTAATCGCCATTCGGTTTCGCAGAGCGCAGTCGAAACCAGACCAGCAGGTTGCATTCAGCCAGTATTC								2257
Majority	G---TC CGCAGGC TCGCCGTC GTTATGC TGA AATTG CC GAC CACXTGGGCC TGAGC GC GCC GGGCGC ACCGTAC XGC TGC								
	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	
adhE Ecoli	G---TC CGCAGGC TCGCCGTC GTTATGC TGA AATTG CC GAC CACTTGGGCTCGAGCGCACCGGGCGCACGTAC TGC TGC								2378
aiP1Ty2	G---TC CGCAGGC TCGCCGTC GTTATGC TGA AATTG CC GAC CACTTGGGCTCGAGCGCACCGGGCGCACGTAC TGC TGC								2378
adhE Stymi	CAAAATTCGCGTCCTCACCGTTGGCTGTCTGAAACGATTCGATCCCGGGCGCGAACCGGTATCCGGCCGCTAAATC								2334
Majority	TAAGATCGAGAAAC TGC TGCATG GC ---TGG AAAGC ATTAAG CTG AXCTGGG TATTC CTAAG TCTATCCG TG AAG CAG								
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	
adhE Ecoli	TAAGATCGAGAAAC TGC TGCATG GC ---TGG AAAGC ATTAAG CTG AXCTGGG TATTC CTAAG TCTATCCG TG AAG CAG								2455
aiP1Ty2	TAAGATCGAGAAAC TGC TGCATG GC ---TGG AAAGC ATTAAG CTG AXCTGGG TATTC CTAAG TCTATCCG TG AAG CAG								2455
adhE Stymi	AAATTCGCGTCCTCACCGTTGGCTGTCTGAAACGATTCGATCCCGGGCGCGAACCGGTATCCGGCCGCTAAATC								2413
Majority	GC GTXCAGG AAG CTGAC TTCCTGGCAC AC GTTGACAAAC TGTCTGAAGA TGC CTTCCG ATGAC CAGTG CACCGGC GCTAAC								
	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	
adhE Ecoli	GC GTXCAGG AAG CTGAC TTCCTGGCAC AC GTTGACAAAC TGTCTGAAGA TGC CTTCCG ATGAC CAGTG CACCGGC GCTAAC								2535
aiP1Ty2	GC GTXCAGG AAG CTGAC TTCCTGGCAC AC GTTGACAAAC TGTCTGAAGA TGC CTTCCG ATGAC CAGTG CACCGGC GCTAAC								2535
adhE Stymi	GC GTXCAGG AAG CTGAC TTCCTGGCAC AC GTTGACAAAC TGTCTGAAGA TGC CTTCCG ATGAC CAGTG CACCGGC GCTAAC								2493
Majority	CCGC GTTATCCG CTGATCTCCG AACTG AAACAGATTC TGCTGATAC CTACTACGGTCG TGATTCACC GAAGG TGAAG T								
	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	
adhE Ecoli	CCGC GTTATCCG CTGATCTCCG AACTG AAACAGATTC TGCTGATAC CTACTACGGTCG TGATTCACC GAAGG TGAAG T								2615
aiP1Ty2	CCGC GTTATCCG CTGATCTCCG AACTG AAACAGATTC TGCTGATAC CTACTACGGTCG TGATTCACC GAAGG TGAAG T								2615
adhE Stymi	CCGC GTTATCCG CTGATCTCCG AACTG AAACAGATTC TGCTGATAC CTACTACGGTCG TGATTCACC GAAGG TGAAG T								2573
Majority	TG CAGCG AAGAAAG ACG TC GTTGC CGC XC CGA AAGCAGAGAA AAAG CG AAA AAATC CGCTTAA								
	2650	2660	2670	2680	2690	2700			
adhE Ecoli	TG CAGCG AAGAAAG ACG TC GTTGC CGC XC CGA AAGCAGAGAA AAAG CG AAA AAATC CGCTTAA								2676
aiP1Ty2	TG CAGCG AAGAAAG ACG TC GTTGC CGC XC CGA AAGCAGAGAA AAAG CG AAA AAATC CGCTTAA								2679
adhE Stymi	TG CAGCG AAGAAAG ACG TC GTTGC CGC XC CGA AAGCAGAGAA AAAG CG AAA AAATC CGCTTAA								2637

Decoration 'Decoration #1': Shade (with deep red at 40% fill) residues that differ from the Consensus.

Figura 15. Alineamiento de los genes *aiP1* de *S. typhi* y *adhE* de *S. typhimurium* y *E. coli*. Se muestra el resultado del alineamiento por Clustal W para los genes *adhE* de *E. coli* (P17547), *aiP1* de *S. typhi* (AF145591) y *adhE* de *S. typhimurium* (U68173). Se destaca en rojo los nucleótidos que no muestran consenso.

Majority	MAVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAALAAADARIPLANMAVAESGMGIVEDKVIKQKFASEYIYNAV	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
AdHe coli	MAVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAALAAADARIPLANMAVAESGMGIVEDKVIKQKFASEYIYNAV	80
AipI typhi	MAVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAALAAADARIPLANMAVAESGMGIVEDKVIKQKFASEYIYNAV	80
AdHe tymi	MAVTNVAELNALVERVKKAQREYASFTQEQVDKIFRAAALAAADARIPLANMAVAESGMGIVEDKVIKQKFASEYIYNAV	80
Majority	KDEKTCGVLSEDDTFGTITIAEPGIIICGIVPTTNPSTAIIFKSLISLKTNRNATIFSPKPRAKEATMKAADI VLQAAIAA	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
AdHe coli	KDEKTCGVLSEDDTFGTITIAEPGIIICGIVPTTNPSTAIIFKSLISLKTNRNATIFSPKPRAKEATMKAADI VLQAAIAA	160
AipI typhi	KDEKTCGVLSEDDTFGTITIAEPGIIICGIVPTTNPSTAIIFKSLISLKTNRNATIFSPKPRAKEATMKAADI VLQAAIAA	160
AdHe tymi	KDEKTCGVLSEDDTFGTITIAEPGIIICGIVPTTNPSTAIIFKSLISLKTNRNATIFSPKPRAKEATMKAADI VLQAAIAA	160
Majority	GAPKDLIGWIDQPSVELSNALMOKPDI MLILA TG GPGMWKAA YSS--GKPA DG VGAGNTPVVIDETADIKRAVASVILMS	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
AdHe coli	GAPKDLIGWIDQPSVELSNALMOKPDI MLILA TG GPGMWKAA YSS--GKPA DG VGAGNTPVVIDETADIKRAVASVILMS	237
AipI typhi	GAPKDLIGWIDQPSVELSNALMOKPDI MLILA TG GPGMWKAA YSS--GKPA DG VGAGNTPVVIDETADIKRAVASVILMS	237
AdHe tymi	ARPCDRLARSENLPVELSN--VDAPPSVTFDPA TGS--RMSYSCICLGSYLSADGQATLRLVL--MKPLIDSNRACGLCT	234
Majority	KTFD---MGVICASEQSVVVDVAVRERFAXNGGYMLQGXELKAVQXVILKNGALNAATVGPAYKIAELAGFSVPE	
	250 260 270 280 290 300 310 320	
AdHe coli	KTFD---MGVICASEQSVVVDVAVRERFAXNGGYMLQGXELKAVQXVILKNGALNAATVGPAYKIAELAGFSVPE	314
AipI typhi	KTFD---MGVICASEQSVVVDVAVRERFAXNGGYMLQGXELKAVQXVILKNGALNAATVGPAYKIAELAGFSVPE	314
AdHe tymi	DAIHLVCGNLCFCT--SLFVVDVAVRERFAXNGGYMLQGXELKAVQXVILKNGALNAATVGPAYKIAELAGFSVPE	311
Majority	TTKILIGEVTVVDESEPFAMKLSPTLAMYRAKDFEEAV EKA EKLVA MG GIG NT SCLYTDQDNQPERVA YFG QMMKTARI	
	330 340 350 360 370 380 390 400	
AdHe coli	TTKILIGEVTVVDESEPFAMKLSPTLAMYRAKDFEEAV EKA EKLVA MG GIG NT SCLYTDQDNQPERVA YFG QMMKTARI	394
AipI typhi	TTKILIGEVTVVDESEPFAMKLSPTLAMYRAKDFEEAV EKA EKLVA MG GIG NT SCLYTDQDNQPERVA YFG QMMKTARI	394
AdHe tymi	TTKILIGEVTVVDESEPFAMKLSPTLAMYRAKDFEEAV EKA EKLVA MG GIG NT SCLYTDQDNQPERVA YFG QMMKTARI	390
Majority	LINTPASQGGIGDLYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSISENVGPKHLINCKTVAKRAEMXWKKLPKSIYFRRGSILPIALDEV	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
AdHe coli	LINTPASQGGIGDLYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSISENVGPKHLINCKTVAKRAEMXWKKLPKSIYFRRGSILPIALDEV	474
AipI typhi	LINTPASQGGIGDLYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSISENVGPKHLINCKTVAKRAEMXWKKLPKSIYFRRGSILPIALDEV	474
AdHe tymi	LINTPASQGGIGDLYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSISENVGPKHLINCKTVAKRAEMXWKKLPKSIYFRRGSILPIALDEV	469
Majority	ITDGHORALIVTDRFLXNNGYADQITSVLKAAGVETEVFEVEA--DPTLSVVRKGAELANSFKPDVIIALGGGSPMDAAK	
	490 500 510 520 530 540 550 560	
AdHe coli	ITDGHORALIVTDRFLXNNGYADQITSVLKAAGVETEVFEVEA--DPTLSVVRKGAELANSFKPDVIIALGGGSPMDAAK	553
AipI typhi	ITDGHORALIVTDRFLXNNGYADQITSVLKAAGVETEVFEVEA--DPTLSVVRKGAELANSFKPDVIIALGGGSPMDAAK	553
AdHe tymi	ITDGHORALIVTDRFLXNNGYADQITSVLKAAGVETEVFEVEA--DPTLSVVRKGAELANSFKPDVIIALGGGSPMDAAK	547
Majority	DMWVMYKPEETHFEELARFMDIRKRIYKFKPMG VKANMIAVTTTSGTGSEVTPFAVVTIDATGQKYPLADYALTPDMAI	
	570 580 590 600 610 620 630 640	
AdHe coli	DMWVMYKPEETHFEELARFMDIRKRIYKFKPMG VKANMIAVTTTSGTGSEVTPFAVVTIDATGQKYPLADYALTPDMAI	633
AipI typhi	DMWVMYKPEETHFEELARFMDIRKRIYKFKPMG VKANMIAVTTTSGTGSEVTPFAVVTIDATGQKYPLADYALTPDMAI	633
AdHe tymi	DMWVMYKPEETHFEELARFMDIRKRIYKFKPMG VKANMIAVTTTSGTGSEVTPFAVVTIDATGQKYPLADYALTPDMAI	625

Majority	VDANLVMDMPKSLC AFGGLDAVTHAMEAYVSVLA SEF SDGQALQALKLLKEYLPASYHEGSKNPVARERVHSAATTIAGIA	
	650 660 670 680 690 700 710 720	
AdhE coli	VDANLVMDMPKSLC AFGGLDAVTHAMEAYVSVLA SEF SDGQALQALKLLKEYLPASYHEGSKNPVARERVHSAATTIAGIA	713
AipI typhi	VDANLVMDMPKSLC AFGGLDAVTHAMEAYVSVLASEFSDGQALQALKLLKEYLPASYHEGSKNPVARERVHSAATTIAGIA	713
AdhE tymi	VDANLVMDMPKSLC AFGGLDAVTHAMEAYVSVLASEFSDGQALQALKLLKEYLPASYHEGSKNPVARERVHSAATTIAGIA	700
Majority	FANAFLGVC KSMANKLG SQFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRP-QARRRYAETADNLGLSAPGDRTA	
	730 740 750 760 770 780 790 800	
AdhE coli	FANAFLGVC KSMANKLG SQFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRP-QARRRYAETADNLGLSAPGDRTA	792
AipI typhi	FANAFLGVC KSMANKLG SQFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRP-QARRRYAETADNLGLSAPGDRTA	792
AdhE tymi	FANAFLGVC KSMANKLG SQFHIPHGLANALLICNVIRYNANDNPTKQTAFSQYDRP-QARRRYAETADNLGLSAPGDRTA	778
Majority	AKIEKLLAWLEXIKAEELGIPKSIKREAGVQEAFLANVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPLISELKQILLDTYVGRDFTFEGEV	
	810 820 830 840 850 860 870 880	
AdhE coli	AKIEKLLAWLEXIKAEELGIPKSIKREAGVQEAFLANVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPLISELKQILLDTYVGRDFTFEGEV	872
AipI typhi	AKIEKLLAWLEXIKAEELGIPKSIKREAGVQEAFLANVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPLISELKQILLDTYVGRDFTFEGEV	872
AdhE tymi	AKIEKLLAWLEXIKAEELGIPKSIKREAGVQEAFLANVDKLSSEDAFDDQCTGANPRYPLISELKQILLDTYVGRDFTFEGEV	858
Majority	AAKIDVV AAPKAEKAKKSAX	
	890 900	
AdhE coli	AAKIDVV AAPKAEKAKKSAX	892
AipI typhi	AAKIDVV AAPKAEKAKKSAX	893
AdhE tymi	AAKIDVV AAPKAEKAKKSAX	878

Decoration 'Decoration #1': Shade (with deep red at 40% fill) residues that differ from the consensus.

Figura 16. Alineamiento de las proteínas AipI de *S. typhi*, AdhE de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se muestra el resultado del alineamiento realizado por el método de Clustal W para las proteínas AdhE de *E. coli* (P17547), AipI de *S. typhi* (AF145591) y AdhE de *S. typhimurium* (U68173). Se destaca en rojo los aminoácidos que no muestran consenso.

coli (P17547), AdhE de *Clostridium acetobutylicum* (P33744), SucD de *Clostridium kluyveri* (P38947), EutE de *E. coli* (P77445) y EutE de *S. typhimurium* (P41793), donde la mayor similitud entre las proteínas se presentó también en el dominio amino terminal de ellas. Al parecer, este programa no tiene registrado en los bancos de datos a la AdhE de *S. typhimurium*, ya que no fue tomada en cuenta para los alineamientos entre proteínas homólogas.

5.3.4. Mutagénesis del gen *aipI* de *S. typhi* Ty2 por inserción del vector suicida pNM2

La cepa *S. typhi* Ty2 mutante en el gen *aipI* (TYT2006) se construyó por inserción del vector suicida pNM2. El plasmidio pNM2 se construyó por clonamiento del fragmento 5' del gen *aipI* en el vector suicida pGP704, el cual posee un origen de replicación *oriR6K* (Miller y Mekalanos, 1988) que requiere del producto del gen *pir* en trans para su replicación. *S. typhi* Ty2 *pir* se electrotransformó con el plasmidio pNM2 seleccionándose las colonias Amp^R. Debido a que pNM2 no puede replicar sin la proteína Pir, las colonias *S. typhi* Amp^R se originarán a partir de la integración del plasmidio en el cromosoma de la bacteria receptora por recombinación homóloga entre el fragmento del gen *aipI* contenido en el vector y el alelo silvestre en el cromosoma (Figura 17). Se obtuvo tres mutantes estables a partir de tres ensayos independientes. Las cuales se confirmaron por determinación de la segregación plasmidial por sucesivos plaques sobre agar LB ampicilina (30 µg/ml). Una de las mutantes *S. typhi* AipI Amp^R

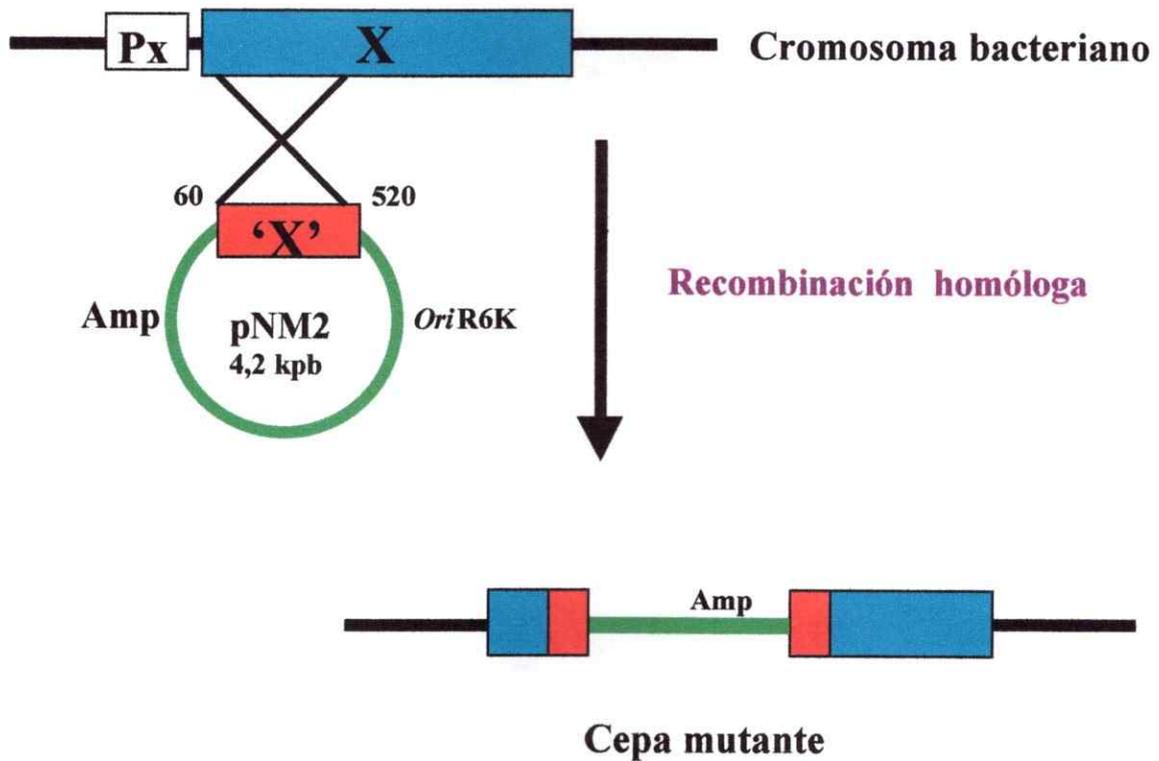


Figura 17. Estrategia de mutagénesis de *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* 14028s con el vector suicida pNM2. Para lograr la inactivación del gen X en el cromosoma bacteriano, se origina una mutante de delección por inserción del vector suicida pNM2. Este plasmidio debe tener clonado un fragmento interno del gen X, el cual por un evento de crossing over puede insertarse por recombinación homóloga en el alelo cromosomal silvestre, logrando así la interrupción del gen blanco.

(TYT2006) obtenidas se analizó por ensayos de hibridación Southern, para confirmar la integración del plasmidio pNM2 en el gen *aipI* (Figura 23 y 25).

5.4. Caracterización de la cepas mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1

Se escogió una de las transformantes *S. typhi*::pNM2 Amp^R (TYT2006) obtenidas para ser sometida a caracterización fenotípica y genotípica. En forma paralela se trabajó con una de las transformantes *S. typhimurium*::pNM2 Amp^R (NPM1), portadora de una mutación homóloga a la del gen *aipI* de *S. typhi*, con el objeto de compararla, a través de los mismos ensayos, con la cepa *S. typhi* TYT2006.

Entonces, se caracterizaron las mutantes *S. typhi aipI* (TYT2006) y *S. typhimurium adhE* (NPM1), analizando algunas de sus propiedades bioquímicas, físicas y genéticas. Para ello se realizó pruebas de crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, composición de proteínas de la ME, motilidad, composición del LPS y pruebas metabólicas en una batería bioquímica bacteriológica.

También, se procedió a caracterizar la mutante *S. typhi aipI* TYT2006 desde un punto de vista genético. Para ello, se comparó el fenotipo y locus cromosomal de la mutante TYT2006 con el de la cepa *S. typhi*::*ims50*::Tn10 (TYT2010). Esta se construyó por transducción de *S. typhi* utilizando como dadora la cepa *S. typhimurium* MS1, donde el transposón interrumpe un gen tipo alcohol deshidrogenasa (*eutE*), localizado en el minuto 50 del cromosoma de *S. typhimurium* y que presenta similitud al gen *adhE* de *E. coli* (Bäumler y col., 1994).

5.4.1. Curva de crecimiento de la mutante *S. typhi* TYT2006 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico

Se cultivó *S. typhi* Ty2 y *S. typhi* TYT2006 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, según las condiciones establecidas. Se determinó la OD₆₀₀ de ambos cultivos en el tiempo y se graficó ambas curvas de crecimiento (Figura 18). Los resultados de estos experimentos indican, que la mutante TYT2006 no presenta defectos de crecimiento en ninguna de las condiciones de cultivo, principalmente en anaerobiosis. Sin embargo, se observó que en aerobiosis TYT2006 crece más rápido que la cepa silvestre, según la determinación de ambos tiempos generacionales. Quizá es probable que la pérdida de una proteína abundante resulte en un alivio energético *in vitro*.

5.4.2. Curva de crecimiento de la cepa mutante *S. typhimurium* NPM1 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico

Se cultivó *S. typhimurium* 14028s y *S. typhimurium* NPM1 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico, según las condiciones establecidas. Se determinó la OD₆₀₀ de ambos cultivos en el tiempo y se graficó ambas curvas de crecimiento (Figura 19). Los resultados de estos experimentos indican, que la mutante NPM1 no presenta defectos de crecimiento en ninguna de las condiciones de cultivo y que en ambos casos, crece más rápido que la cepa silvestre, según la determinación de los tiempos generacionales.

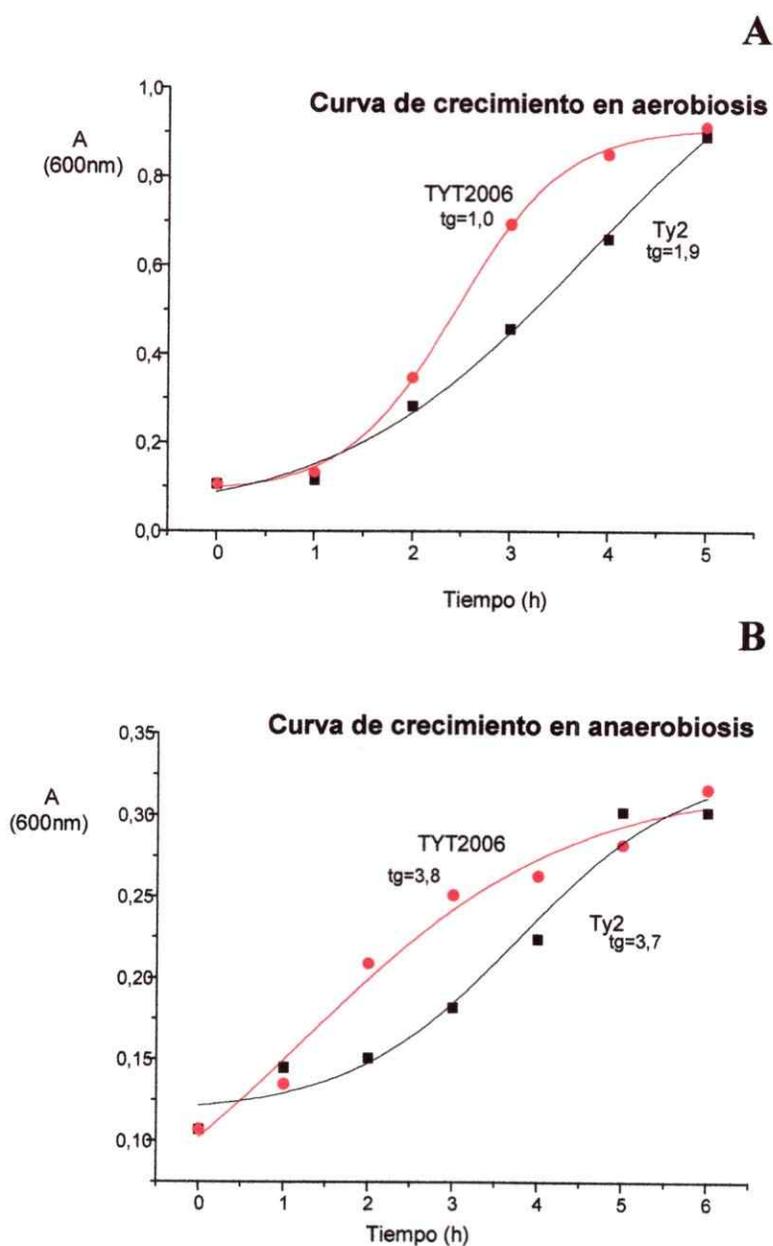


Figura 18. Curva de crecimiento de *S. typhi* y mutante TYT2006 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. En A se muestran las curvas de crecimiento obtenidas para *S. typhi* Ty2 (rojo) y mutante *S. typhi* TYT2006 (negro) en condiciones de cultivo aeróbico en caldo Luria y los tiempos generacionales calculados ($tg = \ln 2 / k \text{ t}^{-1}$). En B las curvas de crecimiento obtenidas para *S. typhi* Ty2 (rojo) y mutante *S. typhi* TYT2006 (negro) en condiciones de cultivo anaeróbico en caldo Luria y los tiempos generacionales calculados.

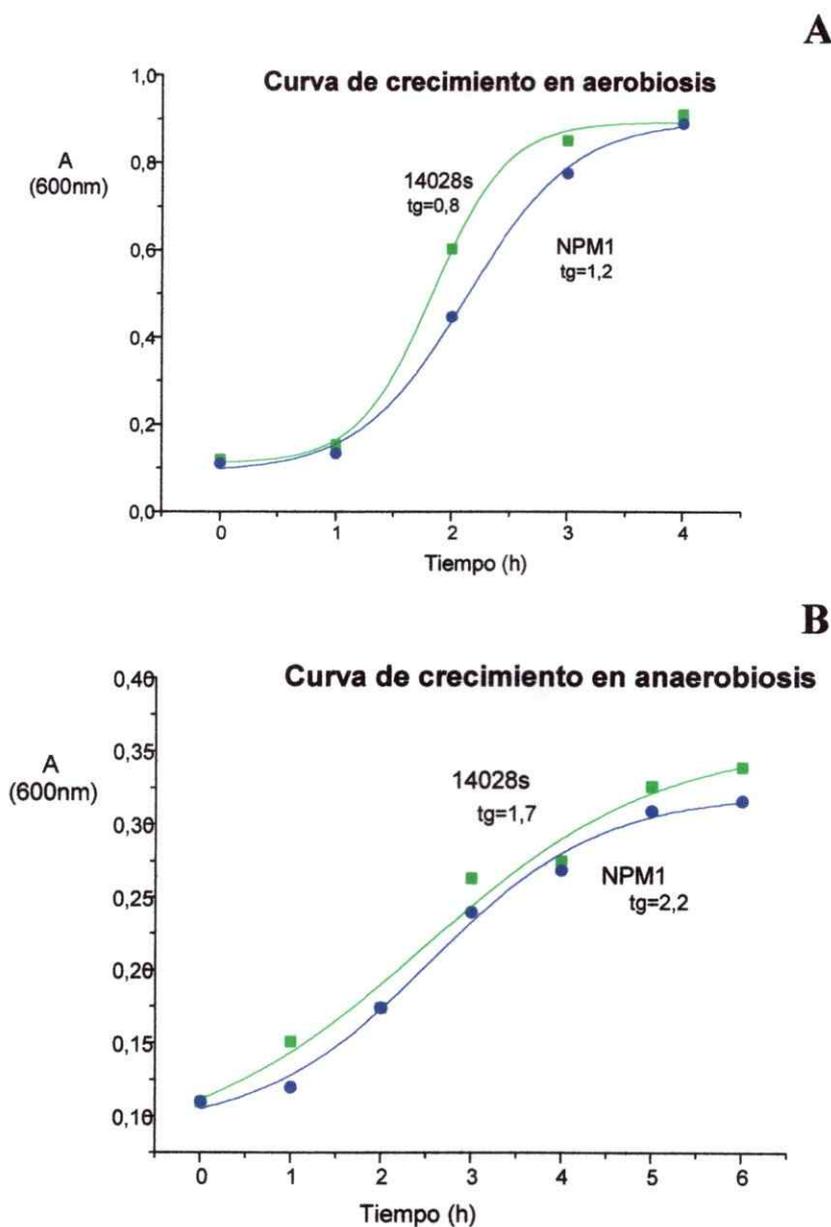


Figura 19. Curva de crecimiento de *S. typhimurium* 14028s y mutante NPM1 en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. En A se muestra las curvas de crecimiento obtenidas para *S. typhimurium* 14028s (verde) y mutante NPM1 (azul) en condiciones de cultivo aeróbico en caldo Luria y los tiempos generacionales calculados ($tg = \ln 2 / k^{-1}$). En B las curvas de crecimiento obtenidas para *S. typhimurium* 14028s (verde) y mutante NPM1 (azul) en condiciones de cultivo anaeróbico en caldo Luria y los tiempos generacionales calculados para cada cepa.

5.4.3. Comparación de las propiedades físicas y bioquímicas de las mutantes de *S. typhi* y *S. typhimurium* obtenidas

La mutante *S. typhi aipl* (TYT2006) y la cepa portadora de una mutación homóloga en el gen *adhE*, *S. typhimurium* 14028s (NPM1), fueron comparadas en cuanto a sus propiedades bioquímicas, utilizando una batería clásica. Se incluyó además la cepa *S. typhi ims50::Tn10* (TYT2010) y todos los controles respectivos. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, los cuales incluyeron motilidad determinada en el medio MIO, se encuentran resumidos en la Tabla 4. En todos los casos, las cepas mutantes, no presentaron diferencias metabólicas en cuanto a la utilización de azúcares simples como glucosa, manosa o sorbitol en aerobiosis o anaerobiosis, ni de movilidad con respecto a la cepa parental respectiva. Se conoce, que la falta de movilidad en *S. typhi* causa una fuerte disminución de su capacidad invasiva a celulares epiteliales en cultivo, no así en *S. typhimurium* (Liu y col., 1988), por lo que se descarta que esta sea la causa de la disminución del fenotipo invasor de la mutante TYT2006. Por otra parte, se sabe que *E. coli* mutantes en alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa, no pueden crecer en medio mínimo fermentando la glucosa en anaerobiosis (Goodlove y col., 1989). Este no parece ser el caso de nuestras cepas mutantes *S. typhi aipl* y *S. typhimurium adhE*, ya que no presentaron deficiencia de crecimiento al ser analizadas en esas condiciones (datos no mostrados).

Tabla 4. Análisis de las cepas *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres y mutantes mediante una batería bioquímica clásica

Propiedad	Cepas <i>S. typhi</i>			Cepas <i>S. typhimurium</i>				
	Ty2	TYT2010	TYT2006	14028s	MS1	LT2	NPM3	NPM1
Glu	Ac/-	Ac/-	Ac/-	Ac/gas	Ac/gas	Ac/gas	Ac	Ac/gas
Lac	-	-	-	-	-	-	-	-
Sac	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	+	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	-	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI*	K/A/H ₂ S	K/A/H ₂ S	K/A/H ₂ S	K/A/H ₂ S	K/A/H ₂ S	K/A/-	K/A/-	K/A/H ₂ S
LIA*	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	K/K/-	K/K/-	K/K/H ₂ S
MIO*	+/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+

*Pruebas combinadas para diferenciar cepas de *Salmonella*. TSI (triple sugar iron); LIA (lysine, iron agar); MIO (motility, indol, ornitine).

K: alcalino; A: ácido.

5.4.4. Composición de la ME de la mutante TYT2006 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

El perfil de proteínas de la ME de la mutante *S. typhi aipl* (TYT2006) crecida en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (1-D) y geles bidimensionales (2-D). Los resultados del análisis unidimensional se muestran en la Figura 20. Las flechas negras indican algunas de las proteínas que son inducidas en anaerobiosis y entre ellas la posición de la proteína Aipl de 100 kDa de *S. typhi* Ty2 (carril c), banda de proteína que no se observa en la mutante *aipl* (TYT2006) (punta de flecha roja, carril b). Este resultado, se complementó con el análisis de la secuencia N-terminal de esta región, del cual no se obtuvo ninguna secuencia de aminoácidos, sugiriendo que el gen *aipl* efectivamente fue interrumpido por el vector pNM2. Se observó además, un interesante efecto pleiotrópico de la mutación de *aipl*: La porina OmpC (punta de flecha negra, carril b) no se induce en anaerobiosis, incluso aparece más disminuída que en aerobiosis (carril e); en anaerobiosis, aparece una proteína de alto peso molecular, de alrededor de 150 kDa (flecha azul), y OmpF (carril d) no está presente en aerobiosis. En cambio, la mutación de la proteína AdhE en *S. typhimurium* no afectó tan drásticamente a las proteínas de la ME de la mutante NPM1, resultado que se muestra más adelante (Fig. 21).

Con el objeto de apreciar mejor los cambios observados en geles unidimensionales y tratar de identificar los productos génicos mutados, se analizó las proteínas de la ME de la mutante TYT2006 crecida en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, por electroforesis bidimensional, según O' Farrell (1975) modificado por

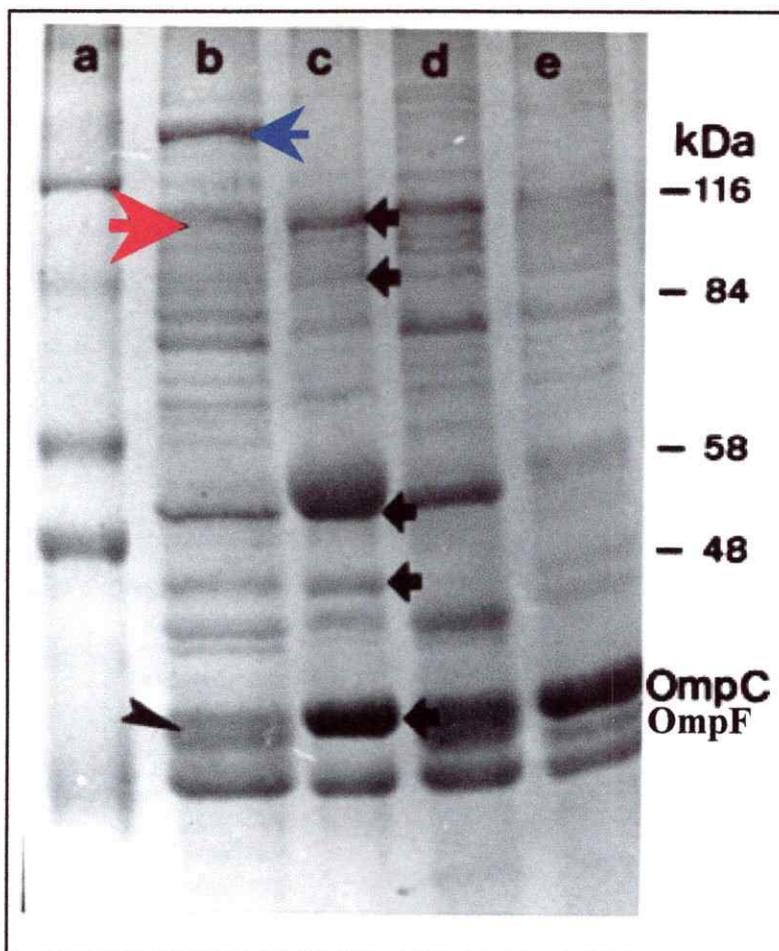


Figura 20. Proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y mutante *S. typhi* TYT2006. Se aislaron las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y de la mutante *S. typhi* TYT2006, mediante el método descrito por Lobos y Mora (1991). Se fraccionaron en geles al 12,5 % de poliacrilamida-SDS y se tiñieron con azul de Coomassie. Se indican las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 mayormente inducidas en anaerobiosis (carril c, flechas negras), de 100, 80, 50, 46 y 36 kDa, respectivamente. En la mutante TYT2006 crecida en anaerobiosis (carril b), la flecha roja señala la ausencia de la proteína de AipI de 100 kDa, la punta de flecha negra señala la disminución de la porina OmpC y la flecha azul, la aparición de una banda de proteína de 150 kDa. En aerobiosis las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 (carril e) y mutante TYT2006 (carril d), donde en (d) se observa en la ausencia de OmpF.

Hochstrasser y col., (1988). Los resultados preliminares, realizados con la cepa silvestre *S. typhi* Ty2, claramente mostraron la inducción de una proteína de alrededor de 100 kDa (pI- 6,4) por la condición ambiental anóxica (Figura 9, B), la cual no se encuentra presente en la mutante TYT2006, tanto en la condición de cultivo aeróbico (Figura 9, C) como anaeróbico (9, D). Más aún, tal como se observó en los geles I-D (Figura 20).

5.4.5. Composición de la ME de la mutante *S. typhimurium* NPM1

El perfil de las proteínas de la ME de la mutante *S. typhimurium adhE* (NPM1) crecida en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La mutación de la proteína AdhE de *S. typhimurium* "similar" a AipI de *S. typhi*, no tuvo un efecto tan drástico sobre la composición de proteínas mayoritarias de la ME en la mutante NPM1. Como se puede observar en la Figura 21, el perfil de proteínas observado en anaerobiosis para la cepa *S. typhimurium* 14028s silvestre (carril c) es similar al de la mutante (carril a), excepto por la banda de proteínas de alrededor de 48 kDa, que no se observa inducida en la mutante NPM1 (flecha roja, carril a). Por el tamaño molecular de esta proteína, se puede suponer que corresponde a la flagelina de *S. typhimurium*. Al comparar la cepa silvestre 14028s, crecida en aerobiosis (carril d), con la mutante NPM1 crecida en la misma condición (carril b), sólo se observa en esta última la aparición de una banda de 65 kDa (flecha azul, carril b).

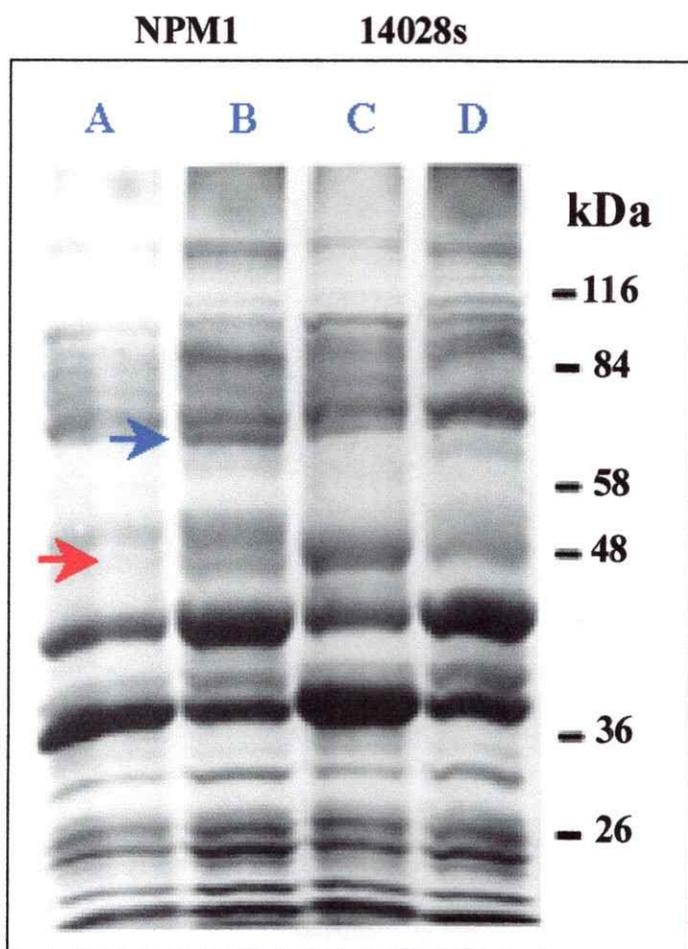


Figura 21. Proteínas de la ME de *S. typhimurium* 14028s y mutante NPM1. Se aislaron las proteínas de la ME de *S. typhimurium* 14028s y mutante NPM1 cultivadas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis por el método de Lobos y Mora (1991), se fraccionó en geles al 12,5 % de poliacrilamida-SDS y se tiñó con azul de Coomassie. Se muestra el perfil de proteínas de la cepa silvestre NPM1 crecida en anaerobiosis (carril a) y aerobiosis (carril c), junto al de la cepa mutante 14028s crecida en anaerobiosis (carril b) y aerobiosis (d), respectivamente.

5.4.6. Análisis del LPS de la cepa mutante *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1

Se sometió a análisis la cepa *S. typhi* Ty2 silvestre y la mutante en el gen *aipI*, TYT2006, (asesorado por la Dra. Inés Contreras). Para ello, se aisló el LPS de ambas cepas, se fraccionó en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñó con nitrato de plata. Los resultados (Figura 22) mostraron que no hay diferencias de tamaño del antígeno O entre la cepa Ty2 silvestre (carril 2) y la mutante TYT2006 (carril 4), por lo que se concluye que ambas cepas son lisas. Como ejemplo se muestra una cepa rugosa, que presenta alteraciones en el tamaño del antígeno O del LPS, la cepa *S. typhimurium* MS868r (carril 5). El análisis de la cepa mutante *S. typhimurium* NPM1 (carril 3) demostró, que la composición del antígeno O del LPS tampoco presentó alteraciones, al ser comparada con la cepa silvestre 14028s (carril 1).

5.4.7. Construcción de la cepa *S. typhi eutE*, mutante en un proteína similar a la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli*

Se construyó una cepa *S. typhi* mutante en el gen *eutE*, el cual presenta similitud al gen *adhE* de *E. coli* y *S. typhimurium*, descrito previamente por Bäumlér y col., (1994) en la cepa *S. typhimurium* 14028r (MS1). En esta cepa MS1, la inserción de Tn10 en el centisoma 50, resultó en una cepa *S. typhimurium* *ims50::Tn10* atenuada en el ratón y con una capacidad disminuida de sobrevivida dentro del macrófago. El análisis de secuencia de este gen, denominado después *eutE*, demostró tener un 52 % de identidad



Figura 22. Composición del LPS de *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres y mutantes TYT2006 y NPM1. Se analizó la composición del LPS en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con nitrato de plata, de las cepas de *S. typhi* Ty2 lisa (2), mutante *S. typhi* TYT2006 (4), *S. typhimurium* 14028s (1) y mutante *S. typhimurium* NPM1 (3). En (5) se muestra la cepa *S. typhimurium* MS868 rugosa.

con el gen *adhE* de *E. coli*. Por eso, para determinar si la proteína AipI de *S. typhi* (similar a AdhE de *S. typhimurium* y *E. coli*) corresponde al gen *eutE* de *S. typhimurium* y tiene un papel en la virulencia de *S. typhi*, se construyó la mutante correspondiente por transducción de la inserción *ims50::Tn10* con el fago P22 desde una cepa *S. typhimurium* *ims50::Tn10* (NPM3) a *S. typhi* Ty2 silvestre. Una de las transductantes Tet^R obtenida (TYT2010), fue sometida a experimentos de invasión sobre células HEp-2 (Tabla 5), experimentos de hibridación Southern (Figura 23) y pruebas bioquímicas (Tabla 4). En resumen, el gen *aipI* de *S. typhi* Ty2, con similitud al gen *adhE* de *S. typhimurium* y *E. coli*, no está relacionado con el gen *eutE* de *S. typhimurium*, localizado en el centisoma 50. Esto resulta del análisis en conjunto de los datos obtenidos: mantención del fenotipo invasor y proliferación intracelular; composición de las proteínas de la ME de la cepa mutante *S. typhi* TYT2010 (no mostrado), comparado al de la cepa mutante TYT2006; tamaño del fragmento de restricción del DNA cromosomal de la cepa TYT2010, el cual es similar a la de *S. typhi* Ty2 silvestre. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que *aipI* de *S. typhi* no corresponde al gen *eutE* de *S. typhimurium*.

5.5. Análisis Southern blot de *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* silvestres

Con el objeto de verificar la presencia de una sola copia de los genes *aipI* y *adhE* en varias cepas de *Salmonella*, se sometió a análisis Southern los cromosomas de *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium* LT2 y *S. typhimurium* 14028s. Para ello, se utilizó como sonda el producto de amplificación obtenido por PCR desde el cromosoma de *S. typhi* Ty2 (500 pb), correspondiente al extremo 5' del gen *aipI*, marcado con ³²P. El análisis

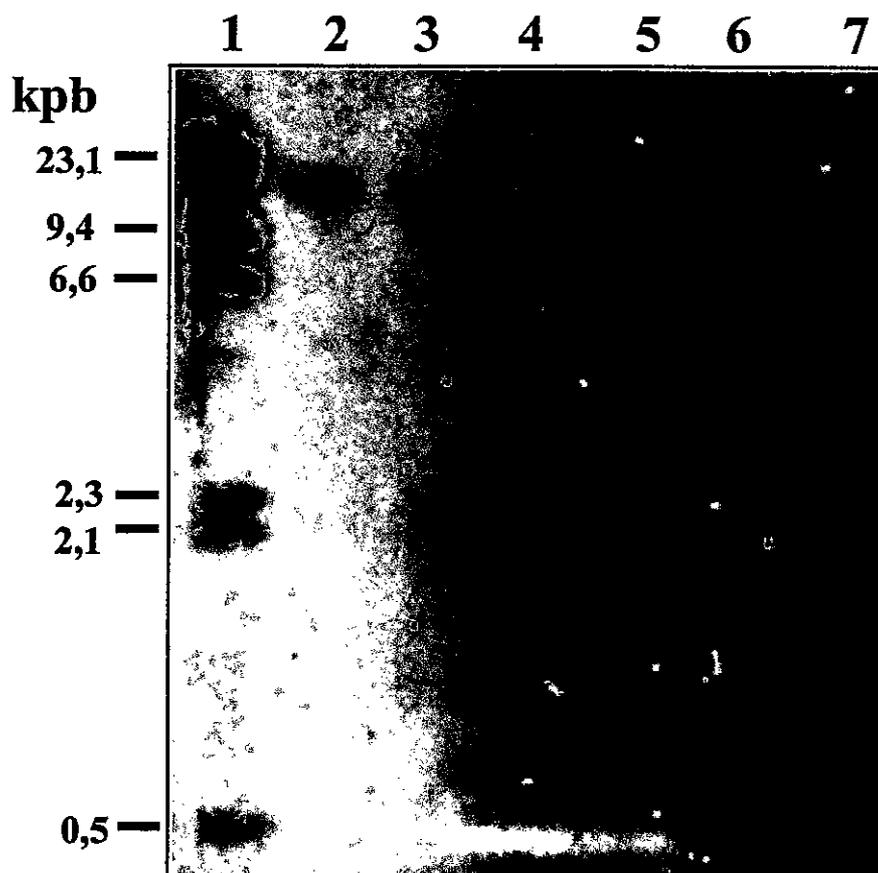


Figura 23. Análisis de Southern blot de los DNAs cromosomales de las cepas *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* silvestres. Los DNAs cromosomales de las cepas *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium* LT2, *S. typhimurium* 14028s y *E. coli* K-12 silvestres, junto a las de las mutantes *S. typhi* TY2010 y *S. typhimurium* MS1, fueron digeridos con *EcoRI*, fraccionados en gel de agarosa al 0,8 %, transferidos a membrana de nylon y luego hibridados con la sonda *aipI* (500 pb) obtenida por PCR, marcada con ^{32}P . Se indica la posición de las muestras correspondientes a: DNA fago Lambda/*HindIII* (1), *E. coli* K-12 (2), *S. typhi* TYT2010 (3), *S. typhimurium* 14028s (4), *S. typhimurium* MS1 (5), *S. typhi* Ty2 (6) y *S. typhimurium* LT2 (7).

de los DNAs incluyó algunas cepas controles, tales como *E. coli* K-12, *S. typhi::ims50* (TYT2010) y *S. typhimurium::ims50* (MS1). Todas las muestras se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI*, la cual no tiene sitios de corte dentro del gen *adhE* informado en GenBank (U68173), el cual utilizamos como referencia para nuestros experimentos. La sonda hibridó con una sola banda de DNA, tanto en las cepas de *S. typhi* como *S. typhimurium* (Figura 23). No obstante, los fragmentos hibridados mostraron diferentes movilidades electroforéticas en ambas especies, donde el fragmento de mayor tamaño fue el de *S. typhi* Ty2 (carril 6), que se mostró similar al de *E. coli* (carril 2), comparado con los de *S. typhimurium* (carriles 4 y 7). Estos resultados sugieren que las regiones que flanquean los genes *aipI* y *adhE* son diferentes, demostrando además la existencia de una sola copia de cada uno de ellos. Los resultados de las cepas mutantes *S. typhi* TYT2010 y *S. typhimurium* MS1, claramente muestran que la inserción Tn10 no se encuentra en el mismo locus que el gen *aipI* o *adhE*, ya que no se modifica el tamaño del fragmento de restricción que da señal de hibridación positiva.

5.5.1. Análisis Southern blot de las mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1

El DNA cromosomal de las mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1 se digirió con *EcoRI* y con una combinación de enzimas que incluyó *EcoRI*, *PstI* y *SfiI*, las cuales se escogieron en base a la secuencia reportada para el gen *adhE* en GenBank (U68173). Como ya se dijo, *EcoRI* no corta dentro del *adhE*, *PstI* reconoce un sólo sitio

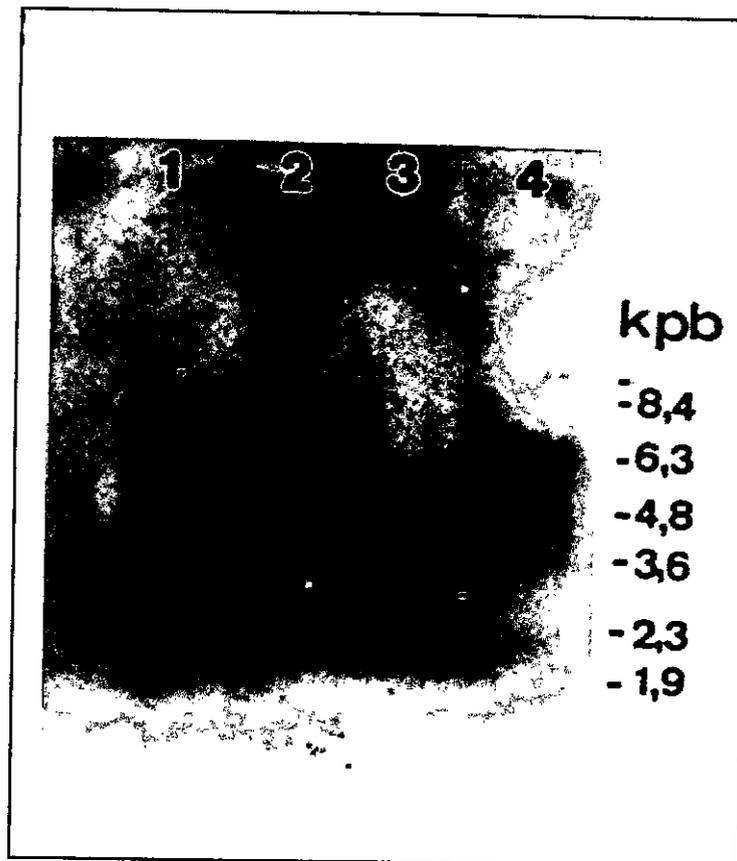


Figura 24. Experimentos de hibridación Southern de los DNAs cromosomales de las cepas mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1. Los DNAs cromosomales de las cepas *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres y mutantes, fueron digeridos con *EcoRI*, fraccionados en geles de agarosa al 0,8 % y luego transferidos a membrana de nylon. Ésta se hibridó con la sonda *aipI* (500 pb) de *S. typhi* Ty2 marcada con biotina en condiciones de alta estrictez. Se observan las bandas de hibridación positiva (8640 pb) para *S. typhi* Ty2 (1), *S. typhimurium* 14028s (5745 pb) (2), mutante *S. typhi* TYT2006 (3) (6270 pb) y mutante *S. typhimurium* NPM1 (5420 pb) (4).

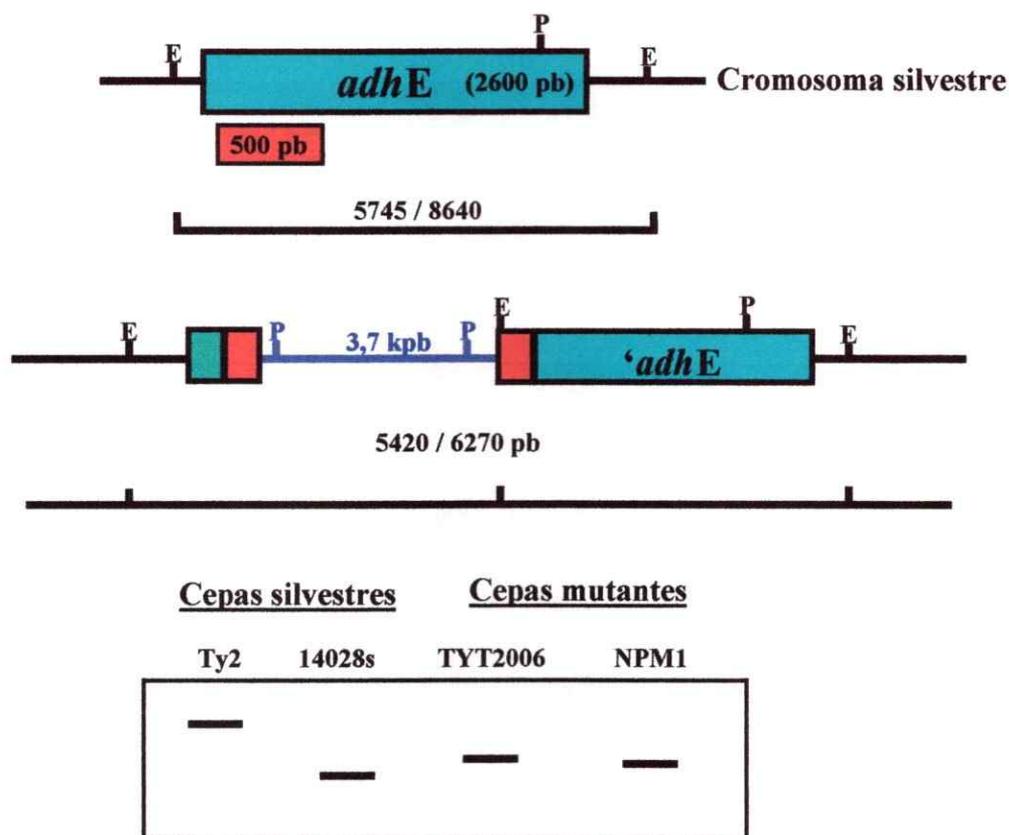


Figura 25. Esquema de los resultados de los experimentos de hibridación de los cromosomas de las cepas mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1. Los DNAs cromosomales de las cepas *S. typhi* Ty2 silvestre y mutante TYT2006, junto al de las *S. typhimurium* 14028s silvestre y mutante NPM1, fueron digeridos con *EcoRI*, fraccionados en gel de agarosa al 0,8%, transferidos a membrana de nylon y luego hibridados con la sonda *adhE*. Los DNAs silvestres de *S. typhi* y *S. typhimurium* mostraron un banda de hibridación positiva de 8640 y 5745 pb, respectivamente. Las mutantes TYT2006 y NPM1, de 6270 y 5420 pb, respectivamente.

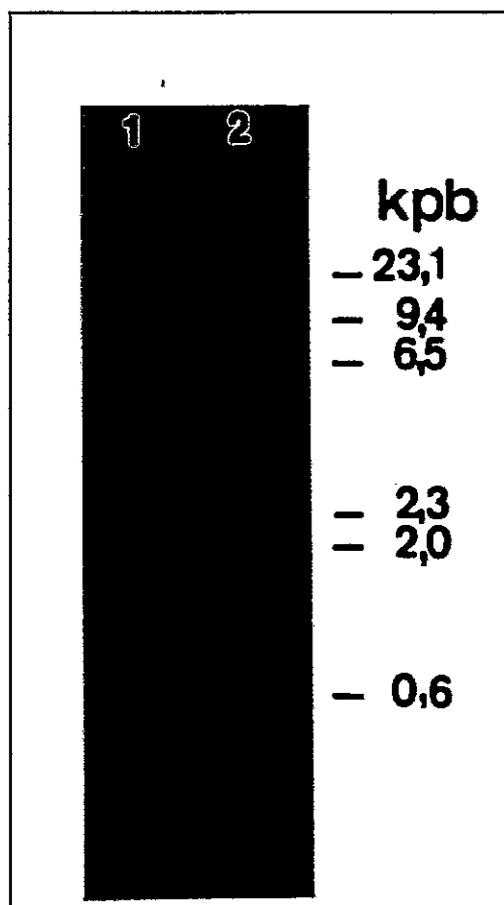


Figura 26. Análisis Southern blot del DNA cromosomal de la mutante *S. typhi* TYT2006. Los DNAs cromosomales de las cepas mutante *S. typhi* TYT2006 y de la cepa parental, *S. typhi* Ty2, fueron digeridos con una combinación de enzimas de restricción, compuesta por *EcoRI*, *PstI* y *SfiI*, luego fraccionados en gel de agarosa al 0,8 %, transferidos a membrana de nylon y entonces hibridados con la sonda *aipI* (500 pb) marcada con biotina. Se muestra los fragmentos de restricción que presentaron hibridación positiva en la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 (carril 2) y la mutante TYT2006 (carril 1).

dentro del extremo 3' y *SfiI* corta una vez dentro de la región de hibridación de la sonda. El análisis del DNA digerido con *EcoRI*, se realizó en esta ocasión con la sonda *aipI* marcada con biotina. La mutante *S. typhimurium adhE::pNM2* (NPM1) mostró una banda ancha de hibridación (Figura 24, carril 4), sugiriendo la presencia de dos bandas de tamaño similar, como era de esperarse, ya que se conserva el sitio *EcoRI* dentro del plasmidio pNM2 integrado. Por el contrario, la mutante *S. typhi aipI::pNM2* (TYT2006) mostró una sola banda de hidridación positiva (Figura 24, carril 2), indicando que *EcoRI* generó dos fragmentos de igual tamaño o que sólo uno de ellos está hibridando con la sonda. En la Figura 25 se muestra un esquema de los resultados obtenidos para la hibridación de los cromosomas de *S. typhi* y *S. typhimurium* silvestres y las mutantes respectivas, con el fin de facilitar la interpretación de los resultados. La evidencia experimental obtenida, permitió comprobar que efectivamente el vector suicida pNM2 se había insertado en el gen *aipI* y *adhE* de *S. typhi* y *S. typhimurium*, respectivamente. Lo que se pudo determinar por los cambios en la movilidad de los fragmentos de restricción de los cromosomas mutantes digeridos con *EcoRI*. Se realizó un experimento adicional con el cromosoma de la mutante de *S. typhi* (TYT2006)¹, para verificar la inserción del vector pNM2 (Figura 26), el cual se digirió con una combinación de enzimas de restricción. Los resultados demostraron claramente la modificación del locus silvestre (carril 2) con respecto al de la mutante (carril 1).

5.6. Evaluación del fenotipo invasor y de proliferación de las mutantes *S. typhi* TYT2006 y *S. typhimurium* NPM1

El objetivo fundamental de este trabajo fue generar mutantes en las proteínas de ME de *S. typhi* Ty2 que observamos como inducidas por la condición ambiental anóxica, para así poder determinar la función de dicha proteína en el proceso de invasión de células epiteliales y en la virulencia de *S. typhi*. Para evaluar el papel de los productos génicos *aipI*, *adhE* y *eutE*, se comparó la capacidad invasiva de las mutantes *S. typhi aipI* (TYT2006), *S. typhi eutE* (TYT2010) y *S. typhimurium adhE* (NPM1) con respecto de las cepas silvestres *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium* 14028s sobre la línea celular epitelial HEP-2 no fagocítica. Se incluyó en estos experimentos, la cepa TYT2010 debido a que porta la inserción *ims50::Tn10*, la cual interrumpe un gen (*eutE*) similar a la alcohol deshidrogenasa de *S. typhimurium* y a la cepa *S. typhi* TYT2007 generada por backcross. Las bacterias se crecieron en anaerobiosis, en condiciones que potencian el fenotipo invasor. Los resultados de los ensayos de invasión demuestran que la mutación del gen *aipI* en *S. typhi* (TYT2006) reduce drásticamente su capacidad para invadir células HEP-2 (Tabla 5) en cultivo. Por el contrario, la mutación del gen *adhE* de *S. typhimurium* (NPM1), no afecta la invasión de HEP-2. Más aún, la mutación del gen *eutE* de *S. typhi* (TYT2010), tampoco alteró la capacidad para invadir células HEP-2. También se ensayó la cepa "backcross" *S. typhi* TYT2007, la cual resultó con un índice de invasión promedio de 50%. Los ensayos de proliferación intracelular demostraron que el índice de proliferación de las mutantes TYT2010 no se afectó significativamente. Por lo tanto, la mutación *ims50::Tn10* transducida a *S. typhi* Ty2 (TYT2010), no hace

Tabla 5. Ensayos de invasión y proliferación de las mutantes de *S. typhi* y *S. typhimurium* sobre células HEp-2 en cultivo

Cepa bacteriana ^a	Indice de invasión % ^b	Indice de proliferación % ^b
<i>S. typhi</i> Ty2	100	100
<i>S. typhi</i> TYT 2006	4	n. d.
<i>S. typhi</i> TYT 2010	113	85
<i>S. typhi</i> TYT 2007	50	n. d.
<i>S. typhimurium</i> 14028s	100	100
<i>S. typhimurium</i> NPM1	130	n. d.

^a Las bacterias se crecieron en anaerobiosis previo al ensayo sobre las células HEp-2.

^b Los valores de porcentaje son el promedio de 4 experimentos similares independientes.
n. d.: No determinado.

que la mutante se comporte igual que la cepa dadora *S. typhimurium* MS1, que presenta un índice de proliferación intracelular disminuído (Bäumler y col., 1994). Todos los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 5. Ellos indican que AipI de *S. typhi* y AdhE de *S. typhimurium* AdhE no tienen la misma función, ya que la mutación en *aipI* y *adhE* tiene diferentes efectos sobre la capacidad invasora de *S. typhi* y *S. typhimurium* en células HEp-2 en cultivo. La evidencia experimental confirma también, que el gen *aipI* no corresponde al gen *eutE* descrito por Bäumler y col., (1994) de *S. typhimurium*, ya que la mutación de cada uno de estos genes, tiene diferente efecto sobre el fenotipo de *S. typhi*. Corolario, la localización del gen *aipI* en el cromosoma de *S. typhi* aún no está determinada.

5.7. Ensayos de virulencia *in vivo*

Desde hace bastante tiempo se han hecho analogías entre la fiebre tifoidea que ocasiona *S. typhi* en el hombre y *S. typhimurium* en el ratón. Por ello, se ha utilizado este animal-modelo para el estudio de los factores de virulencia de ambas especies de *Salmonella* y especialmente, en el caso de *S. typhi*, donde no se cuenta con un modelo de estudio adecuado (Galán, 1996). Debido a que la invasividad de *S. typhimurium* está directamente relacionada con su habilidad de causar tifoidea en el ratón, construimos una cepa de *S. typhimurium* (NPM1) con una mutación similar a la de *S. typhi* TYT2006, para así poder evaluar como afecta esta mutación la virulencia de la bacteria *in vivo*. Se comparó entonces mediante un ensayo de determinación de dosis letal (LD₅₀) la virulencia de la mutante *S. typhimurium adhE* (NPM1) y la cepa parental silvestre

patogénica *S. typhimurium* 14028s. Para ello, se utilizó ratones BALB/C hembras, con los cuales se diseñaron experimentos para determinar LD₅₀ por la vía de la inoculación oral (p. o.). Cabe hacer notar, que se escogió esta vía de infección, porque lo que nos interesó evaluar fue la capacidad de *Salmonella* de invadir el epitelio intestinal *in vivo*. El valor de LD₅₀ obtenido para la cepa silvestre, *S. typhimurium* 14028s, fue de $1,4 \times 10^5$ UFC y la LD₅₀ para la cepa mutante *S. typhimurium adhE* (NPM1) fue de $2,6 \times 10^5$ UFC. Estos resultados indican que la LD₅₀ de la cepa mutante es el doble del de la cepa parental, indicando que no hubo pérdida significativa de la virulencia por la vía oral, según los datos encontrados en la literatura para este tipo de ensayos (Galán, 1996). Donde se acepta como valor significativo desde de 1 orden de magnitud de diferencia entre ambas LD₅₀.

5.8. Determinación de la actividad de alcohol deshidrogenasa de *S. typhi* y *S. typhimurium*

Se intentó determinar la actividad de alcohol deshidrogenasa según los métodos descritos para *E. coli* por Lorowitz y Clark (1982) y por Clark y Cronan (1980). El primero utiliza el sustrato suicida alilalcohol como medio de selección y el segundo la medición de la actividad enzimática en la fracción soluble de la bacteria. En el primer caso, se probaron los rangos de concentración de alilalcohol reportados para *E. coli*, cultivando las cepas de *Salmonella* en placas de agar LB suplementadas con 50, 100 o 200 mM de alilalcohol, a 37°C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (jarra Gaspack). Como *S. typhi* resultó mucho más sensible al alilalcohol que *E. coli* (control) cuando ess

Tabla 6. Determinación de la expresión de alcohol deshidrogenasa mediante ensayo de sensibilidad al sustrato suicida alilalcohol (CH=CHCH₂OH)

	<i>S. typhi</i>			<i>S. typhimurium</i>				<i>E. coli</i>
	Ty2	TYT2010	TYT2006	LT2	MS1	14028s	NPM1	K-12
Cultivo Aer								
LB	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
LB 50 mM	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
LB 100 mM	+++	+++	n. d.	++	+++	n. d.	n. d.	+++
LB 200 mM	++	+++	n. d.	+	+	n. d.	n. d.	++
Cultivo Ana								
LB, Glu 0,2%	++	++	++	++	+	++	++	++
LB, G, 50 mM	-	+	-	-	++	+	+	+
LB, G, 100 mM	-	-	-	-	+	n. d.	n. d.	-
LB, G, 150 mM	-	n. d.	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
LB, G, 200 mM	-	-	n. d.	-	+	n. d.	n. d.	n. d.
LB, G, 10 mM	+	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+	++
LB, G, 20 mM	+	n. d.	+	n. d.	n. d.			+
LB, G, 30 mM	-/+	n. d.	-/+	n. d.	n. d.	-/+	-/+	-/+
LB, G, 40 mM	-	n. d.	-	n. d.	n. d.	+	+	n. d.

+++ : crecimiento positivo y abundante.

++ : crecimiento moderado.

+ : poco crecimiento.

-/+ : A veces crecimiento positivo y otras negativo.

- : crecimiento negativo.

n. d.: no determinado.

crecida en anaerobiosis, se probó concentraciones más bajas del sustrato suicida, las que fluctuaron entre los 10 a 50 mM. Los resultados obtenidos de estos ensayos, se encuentran resumidos en la Tabla 6. Estos no nos permitieron discriminar claramente entre cepas mutantes en alcohol deshidrogenasa y las cepas silvestres que sí la expresan. Pero sí permitió determinar que las sensibilidades a alilalcohol varían entre las cepas de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. typhi*. Al comparar el crecimiento presentado por *E. coli* y *S. typhimurium*, tanto en condiciones de cultivo aeróbico como anaeróbico, existe una tendencia similar de resistencia entre ambas cepas. Sin embargo, *S. typhi* cultivada en anaerobiosis, fue mucho más sensible a alilalcohol, donde una concentración de 30 mM en el medio, ya afecta su crecimiento. Suponemos que esta alta sensibilidad al sustrato suicida puede tener directa relación con la gran cantidad de enzima que se expresa en cada una de ellas y en el lugar donde se localiza. Este ensayo se complementó con la determinación de la capacidad de utilizar etanol como fuente de Carbono en condiciones aeróbicas, en presencia del indicador redox TTC, donde las mutantes forman colonias blancas (indicador en estado oxidado) y las silvestres rojas (indicador en estado reducido, rojo de formazán). Para ello se prepararon placas de medio mínimo con 0,5 % de glucosa, 0,5 % de etanol y cisteína más triptófano para la auxotrofia de *S. typhi*. Se ensayó las cepas *E. coli* EM1, *S. typhi* Ty2, *S. typhi* TYT2010, *S. typhimurium* 14028s, *S. typhimurium* MS1 y *S. typhimurium* LT2. En todos los casos se obtuvo un crecimiento moderado de colonias blancas, lo que estaría indicando que en estas condiciones de cultivo las cepas analizadas no utilizan el etanol como fuente de carbono. Estos resultados concuerdan con los datos encontrados en la literatura, donde se describe que *E. coli* en ausencia de nitrato y a altas concentraciones de fosfato fermenta la glucosa

produciendo principalmente ácido láctico. Por el contrario a bajas concentraciones de fosfato los productos de la fermentación son acetato y etanol (1:1). Cabe destacar que el nitrato inhibe la actividad de alcohol deshidrogenasa (Clark y Cronan, 1980).

Respecto de la medición de la actividad enzimática a partir de extractos bacterianos, nos fue imposible optimizar la técnica para la determinación de actividad de alcohol deshidrogenasa en la fracción citoplasmática de *E. coli* (control), según las indicaciones informadas por Clark y Cronan (1980), por lo que descartó este método de análisis para las mutantes generadas.

5.9. Caracterización de la colección de mutantes de *S. typhi* *zxx::TnphoA*, potenciales mutantes en proteínas de membrana

El transposón *TnphoA* (Figura 2), puede generar fusiones génicas al azar por inserción en el cromosoma de una bacteria. La proteína híbrida expresada muestra actividad de PhoA, cuando se localiza extracitoplasmáticamente, por lo tanto, el uso de *TnphoA* provee de un fuerte enriquecimiento de mutaciones en genes que codifican para proteínas de membrana y de secreción.

Con el objeto de obtener *S. typhi* mutantes en las proteínas de ME inducidas en anaerobiosis, se trabajó con este transposón, como estrategia experimental alternativa a la de genética reversa.

Para introducir *TnphoA* en *S. typhi* Ty2 se utilizó una cepa *S. typhimurium* lisogénica MudP22, que porta el *TnphoA* cerca del sitio *pac*. La lisis se indujo con Mitomicina C, obteniéndose un lisado enriquecido en el transposón, con el cual se

infectó la receptora *S. typhi* *phoN* (Figura 3). Se obtuvo finalmente una colección de 4000 mutantes *S. typhi* *exx::TnphoA Kan^R*, de las cuales se seleccionó sólo aquellas transductantes que resultaron XP⁺. De más o menos 250 colonias azules preseleccionadas, finalmente se seleccionaron 32 que siempre presentaron la mayor intensidad de azul (XP⁺). Luego se seleccionó las fusiones génicas inducidas en anaerobiosis, para después ensayar la capacidad invasiva de las mutantes reguladas por anaerobiosis en la línea celular epitelial HEP-2 y entonces analizar la composición de las proteínas de la ME de las mutantes defectuosas en invasión.

5.9.1. Medición de la actividad de fosfatasa alcalina y determinación de las mutantes reguladas por anaerobiosis

Para determinar cuales de las 32 mutantes XP⁺ seleccionadas presentaba una fusión génica regulada por anaerobiosis, se procedió a medir la actividad de fosfatasa alcalina en medio líquido (Tabla 7). Para ello se crecieron las mutantes en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico, se tomó una alícuota del cultivo, se permeabilizaron las bacterias y se midió la actividad de fosfatasa alcalina en presencia del sustrato cromogénico p-nitrofenil fosfato. La actividad enzimática se expresó en Unidades Miller y la inducción por la condición ambiental anóxica se determinó mediante la razón (ana/aer). Se consideró que una fusión génica era inducida por anaerobiosis cuando la razón (ana/aer) fue mayor que uno. Se obtuvo doce mutantes inducidas por anaerobiosis. Además se observó otras dos mutantes con un fenotipo interesante. Una de ellas la mutante TYT1952, que mostró siempre una actividad enzimática de cero, tanto en

Tabla 7. Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina de las mutantes *S. typhi* $\Delta xcx::TnphoA$ cultivadas en aerobiosis y anaerobiosis.

Cepas ^a	Actividad fosfatasa alcalina ^b		Razón ana/aer
	Aerobiosis	Anaerobiosis	
<i>S. typhi</i> Ty2	14,07	15,00	1,10
TYT1415	14,0	10,0	0,71
TYT1482	12,0	8,0	0,67
TYT1952	0,0	0,0	0,00
TYT1953	3265,0	3782,0	1,16
TYT1954	5446,0	2093,0	0,38
TYT1955	57176,0	11827,0	0,21
TYT1956	5,1	4,9	0,96
TYT1957	8,1	222,0	2,74
TYT1958	4,4	3,9	0,89
TYT1959	269,0	373,0	1,39
TYT1961	39,0	34,0	0,87
TYT1962	34,0	28,0	0,82
TYT1963	43,0	66,0	1,53
TYT1964	48,0	65,0	1,35
TYT1965	145,0	90,0	0,64
TYT1966	21,0	7,5	0,36
TYT1968	92,5	77,0	0,83
TYT1969	47,0	95,5	2,02
TYT1970	33,0	18,0	0,55
TYT1971	43,0	42,0	0,98
TYT1973	29,0	20,0	0,69
TYT1974	3330,0	4545,0	1,36
TYT1975	208,0	134,0	0,64
TYT1976	56,0	40,0	0,71
TYT1977	8,0	2,0	0,25
TYT1978	111,0	134,0	1,21

Continuación Tabla 7.

Cepas ^a	Actividad fosfatasa alcalina ^b		Razón ana/aer
	Aerobiosis	Anaerobiosis	
TYT1979	126,0	254,0	2,02
TYT1980	98,0	96,0	0,98
TYT1981	2,5	0,0	0,00
TYT1982	30,0	66,0	2,20
TYT1983	17,0	126,0	7,40
TYT1984	25,0	27,0	1,06
TYT1985	58,0	16,0	0,28

^aLas cepas mutantes *S. typhi* *zxx::TnphoA*, TYT1952 a TYT1985 son Kan^R y XP⁺.

^bLos valores de actividad de fosfatasa alcalina están expresados en Unidades Miller y corresponden al valor promedio obtenido de tres ensayos independientes.

aerobiosis como anaerobiosis, aún más bajos que los valores de las cepas controles TYT1415 y TYT1482. La otra mutante, TYT1982, no presentó actividad en anaerobiosis. Además, *S. typhi* Ty2, presentó mayor actividad de fosfata en anaerobiosis, lo que podría indicar un estado de activación basal intrínseco por esta condición ambiental.

5.9.2. Ensayos de invasión de las mutantes *S. typhi* $\Delta xcx::TnphoA$ reguladas por anaerobiosis sobre células HEp-2 en cultivo

Una vez seleccionadas las mutantes *S. typhi* $\Delta xcx::TnphoA$ reguladas por anaerobiosis, se procedió a evaluar la capacidad invasiva de algunas de estas mutantes sobre la línea celular epitelial HEp-2. Se introdujo además las cepas controles TYT1415 *phoN* y TYT1482 *phoN*, más la mutante TYT1981 como control adicional, ya que ésta no presentó actividad de fosfatasa alcalina en anaerobiosis (Tabla 7). Para ello se crecieron las bacterias en anaerobiosis en condiciones de cultivo que potencian el fenotipo invasor y se infectó una monocapa confluyente de células HEp-2, según las condiciones establecidas. Luego se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 1 %, se determinó la cantidad de bacterias intracelulares (t_0) y se calculó el índice de invasión asignándole a la mutante TYT1415 *phoN* el 100 % de invasión (Tabla 8). Todas las mutantes analizadas presentaron defectos en invasión, fluctuando entre un rango de 56 % a 4 % del de la cepa parental, siendo la más afectada la cepa TYT1981, que presentó sólo un 4 % de invasión. Por el contrario, la cepa TYT1959 disminuyó sólo en un 44 % su capacidad invasiva.

Tabla 8. Ensayo de invasión de las mutantes *S. typhi zxx::TnphoA* reguladas por anaerobiosis sobre células HEp-2.

Cepas bacterianas ^a	Razón ana/aer	Índice de invasión % ^b
<i>S. typhi</i> Ty2	1,10	100
TYT1415	0,71	90
TYT1482	0,67	80
TYT1957	2,74	21
TYT1959	1,39	56
TYT1963	1,53	17
TYT1969	2,02	27
TYT1979	2,02	14
TYT1981	0,00	4
TYT1982	2,20	13
TYT1983	7,40	29

^a Las bacterias se crecieron en anaerobiosis previo al ensayo sobre las células HEp-2. Las cepas TYT corresponden a mutantes *S. typhi zxx::TnphoA*.

^b Los valores de porcentaje son el promedio de 3 experimentos similares independientes.

5.9.3. Composición de la ME de las mutantes *S. typhi zxx::TnphoA* reguladas por anaerobiosis

Las mutantes *S. typhi zxx::TnphoA*, cuyas fusiones génicas resultaron reguladas por anaerobiosis, se analizaron también desde el punto de vista de la composición de sus proteínas de la ME. Para ello, se crecieron las bacterias en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, según las condiciones establecidas y se aislaron las proteínas de la ME, las cuales se fraccionaron en geles unidimensionales, teñidos con azul de Coomassie. Los perfiles de proteínas obtenidos para un grupo de mutantes se muestra en la Figura 27. De todas las mutantes *S. typhi zxx::TnphoA* reguladas por anaerobiosis analizadas, se pudo detectar dos mutantes con algunas diferencias en el perfil de proteínas comparado con la cepa silvestre *S. typhi* Ty2 cultivada en aerobiosis (carril 2) y anaerobiosis (carril 3) y la receptora TYT1415 (no mostrado). Una de ellas, la cepa TYT1979 crecida en anaerobiosis no presentó la banda de proteína de 100 kDa (carril 7), indicada por la punta de flecha. La otra cepa, TYT1981, la cual no presentó actividad de fosfatasa en anaerobiosis, presentó dos diferencias en el perfil de proteínas de ME. Una de ellas, se observó al crecer la cepa en aerobiosis, donde no se observó la porina OmpF de 35 kDa (carril 10). La otra diferencia, correspondió también a la proteína de 100 kDa, AipI, la cual en este caso no se vió inducida por la condición ambiental anóxica (carril 11). El análisis de los resultados obtenidos, apunta a que quizá este método de análisis de composición de la ME no es lo suficientemente sensible como para detectar más cambios en las proteínas de la ME. No obstante, se pudo detectar estas dos mutantes reguladas por anaerobiosis con cambios en las proteínas abundantes de la ME, TYT1979

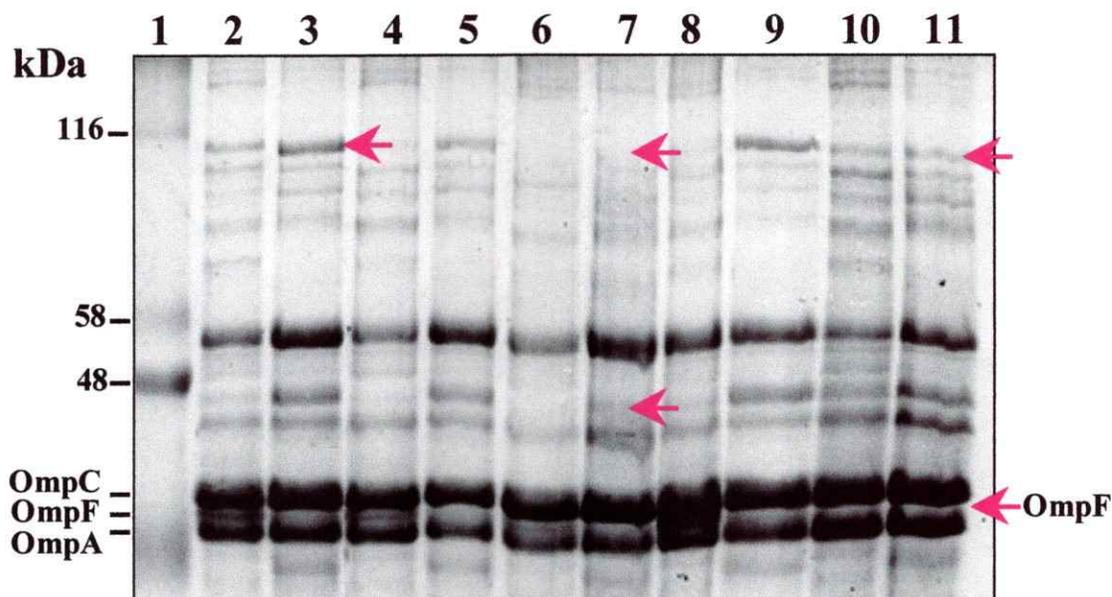


Figura 27. Proteínas de la ME de *S. typhi::TnphoA* cultivadas en aerobiosis y anaerobiosis. Se extrajeron las proteínas de la ME de *S. typhi::TnphoA* crecidas en aerobiosis y anaerobiosis por el método de Lobos y Mora (1991), se fraccionaron en geles al 12,5 % de poliacrilamida-SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. Se indica el estándar de tamaño molecular (carril 1). Se muestra las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 silvestre crecidas en aerobiosis (carril 2) y anaerobiosis (carril 3), donde la flecha violeta indica la proteína AipI y las proteínas de la ME de las cepas mutantes *S. typhi* TYT1963 crecida en aerobiosis (carril 4) y anaerobiosis (carril 5), TYT1979 en aerobiosis (carril 6) y anaerobiosis (7), donde las flechas indican deficiencias en las proteínas de 100 y 46 kDa, respectivamente. TYT1982 en aerobiosis (8) y anaerobiosis (9) y mutante TYT1981 en aerobiosis (10) y anaerobiosis (11). Las flechas indican la posición de las proteínas AipI de 100 kDa y OmpF de 35 kDa.

y TYT1981, las cuales presentaron además serios defectos para la invasión de células HEp-2. Cabe destacar, que la mutante TYT1979 es muy importante en este estudio, ya que presentó un defecto en la proteína AipI, lo cual nos permite confirmar mediante una vía experimental alternativa, que esta proteína con similitud a una alcohol deshidrogenasa en la región N-terminal, está involucrada en la membrana de *S. typhi*. Por otro lado, la mutante TYT1981, que no presentó actividad de fosfatasa alcalina en anaerobiosis tampoco presentó la fuerte inducción de la proteína de 100 kDa, AipI, por esta condición ambiental, lo que podría apuntar a una mutación en un gen regulador, que podría estar además afectando la expresión de la porina OmpF en aerobiosis. La comprobación de estos hechos requiere de el clonamiento de este gen en el futuro.

5.10. Caracterización del suero policlonal anti AipI mediante análisis Western blot de las proteínas de la ME de *S. typhi*

Con el objeto de lograr una herramienta que permita obtener la localización subcelular de la proteína AipI en *S. typhi* Ty2, se fabricó un suero policlonal de conejo anti AipI, el cual permite además analizar la fracción de proteínas de ME de la mutante TYT2006 construída. La calidad y propiedades de los antisueros obtenidos, se ensayó mediante experimentos Western blot (Towbin y Godpon, 1979). Para ello, se aislaron proteínas de la ME de *S. typhi* silvestre y mutante TYT2006, crecidas en aerobiosis y anaerobiosis, las cuales se fraccionaron en geles unidimensionales, se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron con varias diluciones de cada suero policlonal. Se usó como control los sueros preimmune. En la Figura 28, se muestra la reactividad del suero del

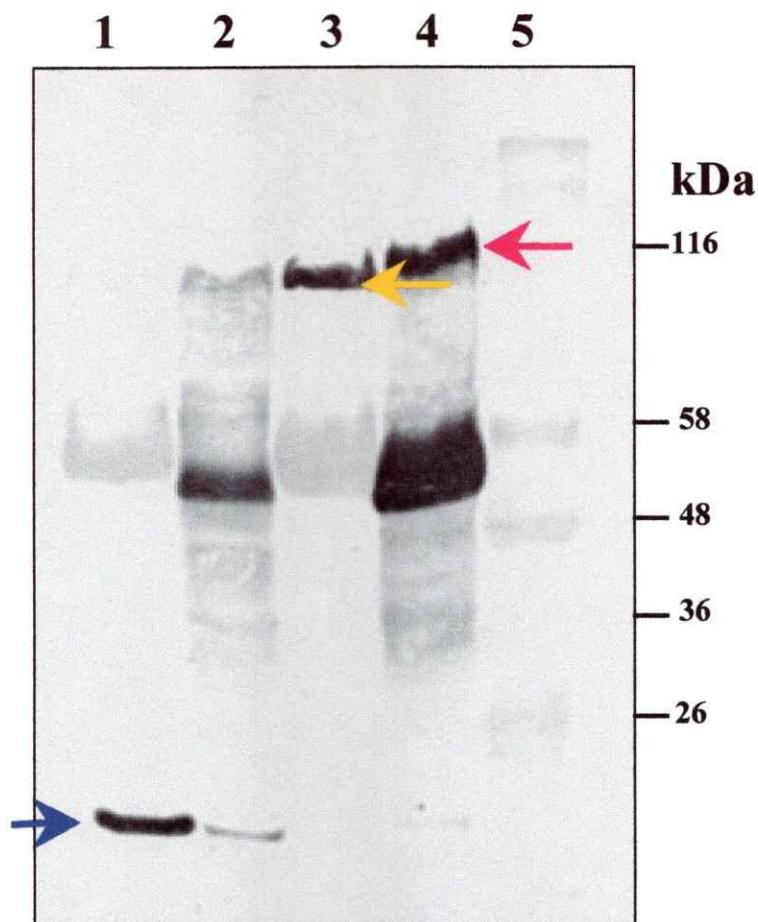


Figura 28. Western blot de proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 y mutante TYT2006. Se muestra un ensayo Western blot de las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 aisladas desde cultivos aeróbicos (carril 2) y anaeróbicos (carril 4), así como de la mutante *S. typhi* TY2006 aislada en aerobiosis (carril 1) y anaerobiosis (carril 3). En (5) estándar de proteínas 7B. La flecha roja indica la banda de reacción positiva de alrededor de 100 kDa, correspondiente a AipI (4). La flecha amarilla indica una banda de reacción de alrededor de 95 kDa en la mutante TYT2006 crecida en anaerobiosis (3). La flecha azul indica una señal positiva de alrededor de 30 kDa en la mutante TYT2006 crecida en aerobiosis (1).

conejo 1 diluido 1:1000 con las proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 crecida en aerobiosis (carril 2) y anaerobiosis (carril 4), junto a las proteínas de la ME de la cepa mutante TYT2006 crecida en aerobiosis (carril 1) y anaerobiosis (carril 3). Los resultados de la inmunoreacción muestran, que la proteína AipI es reconocida por el suero policlonal anti AipI (100 kDa) en la fracción de ME de *S. typhi* crecida en anaerobiosis y que presenta reacción cruzada con una proteína que migra a la altura de la flagelina (50 kDa). La misma banda de reacción positiva no se observa en la mutante TYT2006, sino que se observa una de menor tamaño (95 kDa), lo que demuestra la ausencia de la proteína AipI silvestre. Este resultado se correlaciona con lo observado en los geles unidimensionales teñidos con azul de Coomassie, donde tampoco se observa la banda de 100 kDa en la cepa mutante (Fig. 20). No obstante, la banda de inmunoreacción positiva que se observa en la muestra de proteínas de la ME de la cepa TYT2006 crecida en anaerobiosis, se podría deber a la fusión del fragmento génico 5' de *aipI* a otro segmento de DNA, que al ser traducido, genera una proteína inactiva, pero que es inmunoreactiva. También se observa una señal positiva en la cepa mutante TYT2006 crecida en aerobiosis (carril 1), de alrededor de 30 kDa.

5.11. Análisis de las proteínas de superficie de *S. typhi* Ty2 mediante inmunofluorescencia indirecta

Se preparó un suero policlonal de conejo anti AipI con el objeto de obtener la localización subcelular de la proteína AipI en *S. typhi* Ty2. Este suero anti AipI, previamente analizado en ensayos Western blot (Fig. 29), se probó en ensayos de

inmunofluorescencia indirecta. Los resultados permitieron observar reacción positiva con las proteínas de superficie de *S. typhi* crecidas en condiciones de cultivo anaeróbico (Figura 29). En tanto que la cepa mutante TYT2006 analizada en las mismas condiciones presentó marcas fluorescentes, pero en mucho menos cantidad por bacteria. Ambas cepas crecidas en aerobiosis casi no presentaron marcas fluorescentes. Estos resultados claramente apuntan a que efectivamente la proteína AipI se ubica en la ME de la bacteria y en mayor cantidad cuando ésta es crecida en condiciones anaeróbicas. Tal vez, esta ubicación en la ME es transitoria y correspondería a una proteína en vía de secreción o excreción.

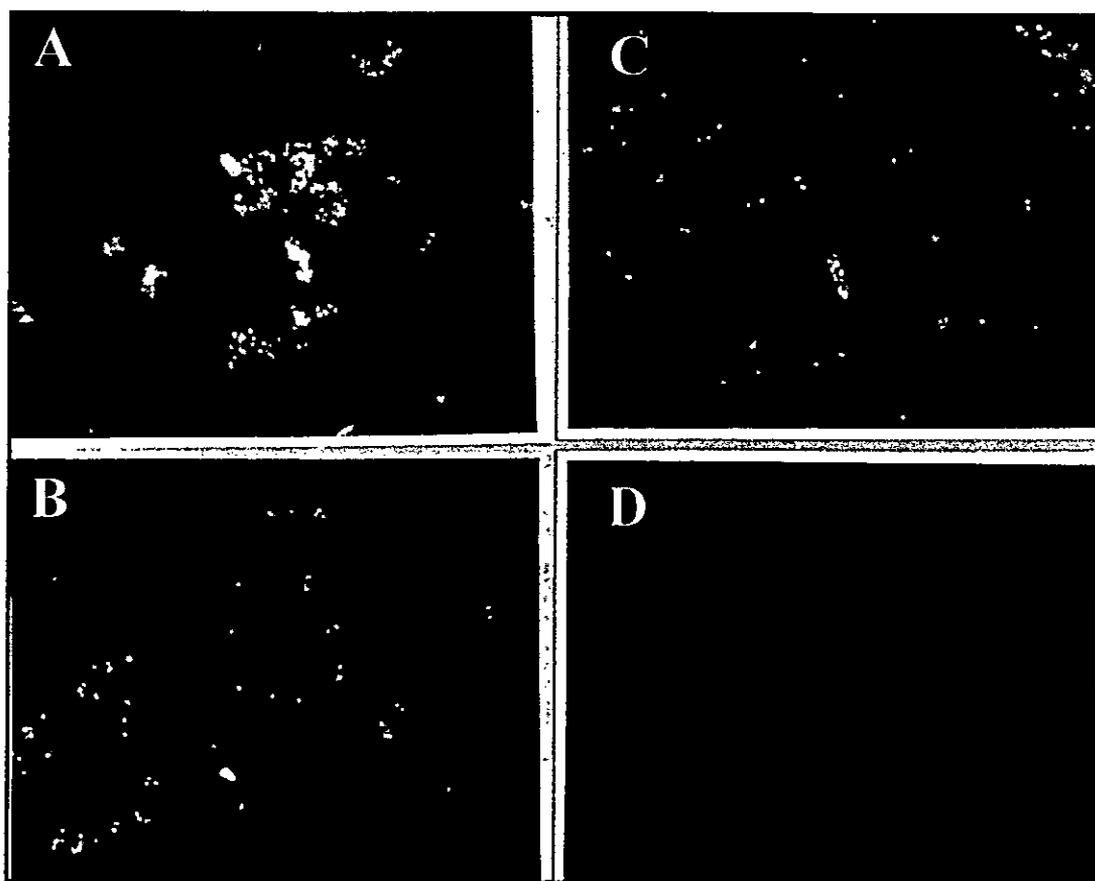


Figura 29. Microscopía de inmunofluorescencia indirecta de bacterias vivas. Se muestra el ensayo de inmunofluorescencia indirecta realizado con las bacterias vivas, correspondientes a *S. typhi* Ty2 crecida en anaerobiosis (A) y aerobiosis (C) y *S. typhi* mutante TYT2006, cecida en anaerobiosis (B) y aerobiosis (D). Se incubó con el suero policlonal de conejo diluído 1/500 y se reveló con anti IgG de conejo-FITC 1/50.

6. DISCUSIÓN

Las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para colonizar al hospedero tan eficientemente como sea posible, incluso en presencia de las defensas de éste, adaptándose a las condiciones ambientales que encuentran, regulando de manera coordinada la expresión de los genes que codifican factores de virulencia (Mekalanos, 1992; Salyers y Whitt, 1994).

S. typhi, que produce la fiebre tifoidea sólo al ser humano, también se adapta a las condiciones ambientales que encuentra en el interior de su hospedero. Sin embargo, aún se conoce muy poco acerca del efecto que las señales ambientales tienen sobre la expresión de los genes de virulencia de *S. typhi* (Leclerc y col., 1998; Arricau y col., 1998). Una de las condiciones que encuentra en el interior de su hospedero es una baja disponibilidad de oxígeno, tanto en el ileo distal como en los tejidos la concentración de oxígeno libre es baja, lo que constituye para la bacteria un ambiente microaerofílico cercano a la anaerobiosis. En la actualidad se sabe que, *S. typhi* aumenta su invasividad a células epiteliales *in vitro* cuando se crece en anaerobiosis (Contreras y col., 1995b; Tartera y Metcalf, 1993). La anaerobiosis también induce el fenotipo invasor de *S. typhimurium* (Jones y Falkow, 1994), sin embargo, en ambos casos no se conoce las causas de esta potenciación. Más aún, mutantes de *S. typhi* defectuosas en genes inducidos en condiciones de cultivo anaeróbico, como aquellos involucrados en el sistema de respiración por nitrato (Contreras y col., 1997) o en fermentación (Toro, 1998), también presentan un fenotipo invasor disminuído. Por lo tanto, la anaerobiosis regularía la expresión de los genes del metabolismo anaeróbico, considerados genes

“housekeeping”, así como también genes que codifican aquellos factores de virulencia involucrados directamente en la infección.

Se conoce que en condiciones de cultivo anaeróbico, hay una fuerte inducción de 6-8 proteínas de la membrana externa de *S. typhi* Ty2 (Contreras y col., 1997), pero no se ha demostrado la participación de estas proteínas en la adherencia e invasión del epitelio intestinal. Más aún, en otros patógenos como, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Vibrio cholerae* o *S. typhimurium*, se ha demostrado que algunas proteínas de la ME establecen contacto directo con los epitelios e interactúan con los macrófagos (Groisman y Ochman, 1994; Salyers y Whitt, 1994). Se demostró que *S. typhimurium* cultivada en anaerobiosis potencia su invasividad a células Henle 407 y modifica la expresión de al menos dos proteínas de la ME (Shiemann y Shope, 1991). *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, incubadas a 37 °C, comienzan a producir gran cantidad de proteínas involucradas en patogenicidad, denominadas Yops (*Yersinia* outer membrane proteins). Las proteínas P1 y YopA, forman una matriz fibrilar en la superficie de la bacteria, que le confiere resistencia a la actividad bactericida del suero humano y favorece la colonización intestinal en el ratón (Michiels y col., 1990). El gen *toxR* de *Vibrio cholerae* codifica para una proteína de transmembrana, capaz de unirse al DNA y activar la transcripción del gen *tcpA*, que codifica para la subunidad mayor de un Pilus factor de colonización (TCP), así como también regular la expresión de las porinas OmpT y OmpU (Miller y Mekalanos, 1988).

Investigaciones más recientes, realizadas en *S. typhimurium*, han permitido demostrar que la disponibilidad de oxígeno es una señal ambiental importante, que junto a la osmolaridad, el pH y el sistema de dos componentes PhoP/Q, están regulando en

forma coordinada la expresión de genes esenciales para la invasión, en respuesta a cambios del medio ambiente (Bajaj y col., 1996; Johnston y col., 1996). En tales eventos el activador transcripcional HilA tiene un papel central, actuando directamente sobre los promotores de los genes de invasión de *S. typhimurium* (Bajaj y col., 1996), el cual a su vez está controlado por el activador SirA. Este último, también parece formar parte de un sistema regulador de dos componentes. SirA se fosforilaría en respuesta a las señales ambientales que *S. typhimurium* detecta dentro del hospedero. Además, estaría iniciando una cascada de síntesis de factores transcripcionales, lo que lleva a la transcripción de genes de invasión, a la secreción de Ssp y a la invasión del epitelio intestinal (Johnston y col., 1996).

El estudio presentado en esta tesis, se concentró en la identificación de proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2 que son inducidas en condiciones de cultivo anaeróbico (Contreras y col., 1995b) y en la aplicación de un método para la construcción de mutantes en estas proteínas de membrana (genética reversa), con el fin de evaluar el rol de dichas proteínas sobre el fenotipo invasor de la bacteria, ensayado en células epiteliales de origen humano en cultivo. Existía el precedente en la literatura, en que esta estrategia experimental resultó exitosa para la inactivación del gen *toxR* de *Vibrio cholerae*; en este caso se interrumpió el gen mediante una mutación por inserción de un vector suicida nuevo (Miller y Mekalanos, 1988).

Como estrategia alternativa de mutagénesis, se usó un procedimiento genético clásico, el transposón *TnphoA* (Manoil y Beckwith, 1985), que favorece la selección de *S. typhi* mutantes en proteínas de membrana. Esta estrategia experimental ha permitido

obtener *S. typhi* mutantes en genes de invasión y regulados por señales ambientales (Leclerc y col., 1998).

El primer objetivo de este trabajo consistió en caracterizar las proteínas de la ME de *S. typhi* inducidas por la condición ambiental de baja disponibilidad de oxígeno (Contreras y col., 1995b). Para ello, se aisló las proteínas de la ME por tres métodos distintos, escogidos según los antecedentes encontrados en la literatura para la extracción de estas proteínas desde enterobacterias como *S. typhimurium*, *S. typhi*, *E. coli* y *Yersinia* spp. (Lobos y Mora, 1991; Nikaido, 1994; Michiels y col., 1990), seleccionándose finalmente el método de Lobos y Mora, (1991), para realizar esta investigación. Estos análisis se complementaron con el estudio de la fracción de proteínas de la membrana interna (MI) de *S. typhi* crecida en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, lo que permitió descartar la contaminación de las ME con otras proteínas bacterianas, validando así el método, desde el punto de vista operacional y en base a la solubilidad descrita para las proteínas de ambas fracciones en el detergente Triton X-100 (Nikaido, 1994).

Los perfiles de proteínas analizados por densitometría, permitieron confirmar la inducción de al menos siete proteínas de la ME de *S. typhi* por la condición de cultivo anaeróbico, de 100, 80, 50, 46, 44, 36, 25 y 20 kDa.

Con el objeto de verificar que las proteínas de la ME que estábamos aislando, efectivamente están expuestas en la superficie bacteriana, se diseñó un experimento complementario en que se utilizó el reactivo NHS-biotina (Bradburne y col., 1993) para marcar *in vivo* las proteínas de superficie de *S. typhi* Ty2 crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. El análisis de los perfiles de proteínas biotinizadas

obtenidos comparados con los de las proteínas sin marcar, teñidos con azul de Coomassie, permitió demostrar que en ambas condiciones las proteínas presentes son similares. Es decir, el perfil de proteínas biotiniladas es el mismo que el de las proteínas sin marcar, tanto en aerobiosis como anaerobiosis, indicando que las proteínas de ME aisladas efectivamente se encuentran en la superficie de la bacteria. Cabe destacar, que las proteínas biotiniladas no parecen alterar su patrón de migración electroforético en geles de poliacrilamida-SDS, ya que aparecen con una masa molecular similar a la de las proteínas sin biotinar. Sin embargo, no fue posible detectar la inducción de proteínas en anaerobiosis, seguramente debido a que la incorporación de biotina a las proteínas no es cuantitativa (Bradburne y col. 1993).

El siguiente paso fue caracterizar las proteínas de la ME de *S. typhi* mediante análisis en geles bidimensionales. Se extrajo las proteínas de la ME de bacterias crecidas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico (Lobos y Mora, 1991) y se sometieron a electroforesis de dos dimensiones, según el método de O'Farrell, (1975) modificado (Hochstrasser y col., 1988). La comparación de ambos patrones de proteínas de la ME permitió verificar la inducción de algunas proteínas por la baja disponibilidad de oxígeno, así como la represión de otras. Los cambios en los patrones de proteínas observados en general son más evidentes que en los geles unidimensionales (Lobos y Mora, 1991). Además, permite aislar las proteínas en una forma más pura para su identificación y estudio, por lo que esta técnica es una valiosa herramienta de análisis de mutantes en proteínas de interés.

El siguiente objetivo consistió en identificar las proteínas de la ME mayormente inducidas en anaerobiosis. Para ello, se sometió a microsecuenciación de Edman el

extremo N-terminal de las proteínas de 100, 80, 50, 46, 44 y 20 kDa. La proteína de 36 kDa, corresponde a la porina OmpC, la cual previamente había sido informada como inducida por esta condición ambiental (Contreras y col., 1995a). De las otras seis, de sólo una de ellas, de la de 80 kDa, no se obtuvo secuencia, posiblemente por presentar el extremo N-terminal bloqueado. Las otras cinco secuencias de aminoácidos obtenidas se analizaron en los bancos de datos disponibles (NCBI y Sanger Centre) mediante el programa BlasP.

Los resultados indicaron que la mayoría de las proteínas correspondieron a proteínas clásicas de la ME, como flagelina, MalL o PhoE. Claro que ninguna de ellas había sido previamente reportada como inducida por la condición ambiental anaeróbica, ni en *S. typhi*, *S. typhimurium* o *E. coli*. Otras dos proteínas presentaron propiedades únicas. Una, la más pequeña (20 kDa), no mostró similitud con ninguna proteína procarionte descrita a la fecha, por lo que podría corresponder a una proteína presente sólo en *S. typhi*. La otra, AipI (100 kDa), mostró 100% de similitud de su extremo N-terminal con la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Cabe hacer notar, que en todos los casos, la movilidad electroforética de las proteínas secuenciadas, mostraron masas moleculares correspondientes con las descritas para las proteínas similares de *Salmonella* o *E. coli*.

Debido a la movilidad electroforética informada para la PhoE, se propone que AipIV correspondería a la porina PhoE de *S. typhi* (Qi y col., 1996). En *S. typhimurium* se demostró que esta porina anión selectiva se induce cuando la bacteria es crecida en condiciones limitantes de fosfato (Bauer y col., 1985), habiendo sido luego localizada en el centisoma 7,6 del mapa cromosómico (Sanderson y col., 1995). Sin embargo, un

estudio inmunológico sugirió que PhoE de *S. typhimurium* no estaba cercanamente relacionada a las porinas generales de *E. coli* y otras *Salmonellas*, tales como OmpF, OmpC y OmpD (Spierings y col., 1992). Por otra parte, en estudios posteriores Janssen y col., (1995) informaron la inducción del promotor *phoE* durante la invasión de *S. typhimurium* a células eucariontes. No obstante, la interrupción del gen *phoE* no afectó la invasividad de la bacteria.

El siguiente paso en este estudio fue elegir la proteína de la ME que se iba a mutagenizar tomando en cuenta los antecedentes encontrados en la literatura. En el caso de PhoE, se conoce que esta porina anión-selectiva se induce en condiciones limitantes de fosfato, pero también se ha descrito la inducción del promotor *phoE* durante la invasión de *S. typhimurium* a células en cultivo. Sin embargo la interrupción de este gen no afecta el proceso de invasión de la bacteria (Janssen y col., 1995). La flagelina, componente principal del flagelo, tiene que ver con la movilidad de la bacteria, habiéndose comprobado que *S. typhi* necesita una motilidad intacta para invadir en forma eficiente, no así *S. typhimurium* (Liu y col., 1988). La inducción de la flagelina en anaerobiosis podría estar dando cuenta, en parte, de la potenciación del fenotipo invasor de *S. typhi*. La porina Mall, por su parte, tiene que ver con la captación y catabolismo de maltodextrinas. Además, puede formar pequeños poros de difusión para iones y solutos hidrofílicos (Meyer y col, 1997). Tales resultados sugieren que, la inducción de PhoE y Mall sería parte de un proceso de adaptación metabólico de la bacteria en el interior de su hospedero, en respuesta a la baja de disponibilidad de nutrientes que encuentra. En *S. typhi* se ha descrito un proceso similar. Por ejemplo, la deficiencia de hierro en el medio ambiente afecta la virulencia de *S. typhi*, por lo que la bacteria ha

desarrollado mecanismos específicos para su captación, como la producción de enteroquelina, cuyo transporte se supone asociado a proteínas de la ME (Furman y col., 1994).

El hecho de que la proteína AipI de 100 kDa presente un N-terminal con similitud a una enzima del tipo alcohol deshidrogenasa es muy interesante, debido a que la mayoría de las enzimas que funcionan en procesos citoplasmáticos bacterianos, se encuentran en cantidades catalíticas y no se encuentran localizadas en la ME (Spiro y Guest, 1991). Sin embargo, en la literatura se ha informado que el proteoma de *S. typhimurium* permite la formación de complejos multiproteicos grandes que pueden cosedimentar con la fracción de membrana durante la preparación de la envoltura celular (Qi y col., 1996). Más aún, otros autores también han constatado la presencia de proteínas con similitud a la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli* asociadas a la membrana de *S. typhimurium*. Éstas, denominadas EutE y EutG, mostraron actividad de alcohol deshidrogenasa y resultaron ser parte del operón para la utilización de la etanolamina (Stojiljkovic y col., 1995).

El análisis de los antecedentes presentados nos hizo seleccionar la proteína AipI (100 kDa) como blanco de mutagénesis, fundamentados principalmente en el hecho de la ausencia de información en la literatura acerca de este tipo de proteínas en *S. typhi* y a la curiosidad que despertaba la presencia de una proteína con similitud a una enzima sólo en la ME de este patógeno, en cantidad tan abundante en anaerobiosi y que al igual que otras proteínas de la ME, es insoluble en Triton X-100 (Nikaido, 1994).

Con este fin, se empleó la estrategia de genética reversa, donde a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína que se desea inactivar, se

diseña una metodología para mutagenizar directamente el gen que la codifica en el cromosoma bacteriano (Miller y Mekalanos, 1988).

El análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína Aipl en el programa BlastP (Altshul y col.,1990; Altshul y col., 1997), indicó similitud de secuencia con el extremo 5' del gen *adhE* de *S. typhimurium* y *E. coli*, ambos informados en GenBank. Estos datos permitieron diseñar la estrategia de mutagénesis del gen *aipI* de *S. typhi*. Ello involucró la amplificación de un fragmento interno del gen *aipI* de *S. typhi* por PCR, correspondiente al extremo 5' del gen, el cual se secuenció, se utilizó como sonda en experimentos de hibridación Southern y luego se clonó en el vector suicida pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988), para generar el plasmidio pNM2.

El producto de PCR, usando como templado el DNA cromosomal de *S. typhi*, fue de 500 pb. Lo mismo se obtuvo a partir de los cromosomas de *S. typhimurium* y *E. coli*. La identidad de los productos de amplificación generados se verificó mediante la secuenciación de los fragmentos génicos *aipI* y *adhE*, los cuales fueron luego analizados en los bancos de datos disponibles en NIH-NCBI mediante el programa BlastN (Altshul y col.,1990; Altshul y col., 1997). Ambos fragmentos presentaron alineamiento de secuencia con el gen *adhE* de *S. typhimurium* y *E. coli*. Posteriormente, la nueva secuencia de 500 pb, correspondiente al extremo 5' del gen *aipI* de *S. typhi*, se envió a GenBank, donde se le asignó el número de acceso AF145591.

La secuencia de DNA obtenida para el fragmento *aipI* (500 pb) de *S. typhi* también se analizó mediante Basic BlastN en Sanger Centre, donde mostró identidad de secuencia dentro del contig 352 de un tamaño de 374 kpb. El estudio de las secuencias de DNA río arriba y río abajo de la coincidencia entre ambas secuencias, junto al

análisis en el programa EditSeq, permitió identificar un posible marco de lectura de la proteína AipI. Este ORF tiene un largo de 2679 pb, que al ser traducido en el programa DNASTar origina una proteína de 893 aminoácidos de 98 kDa. Esta proteína, analizada en NCBI mediante BlastP, indicó similitud con la AdhE de *E. coli* (892 aminoácidos, 96 kDa) y AdhE de *S. typhimurium* (878 aminoácidos, 97 kDa). El análisis de AipI en el programa PredictProtein, indicó también similitud con una serie de alcohol deshidrogenasas, entre ellas la AdhE de *E. coli* y EutE de *S. typhimurium*. En todos los casos, la similitud de las proteínas comparadas es mayor en el dominio N-terminal de éstas. El estudio detallado de la secuencia nucleotídica de los genes *adhE* de *E. coli*, *adhE* de *S. typhimurium* y *aipI* de *S. typhi*, reveló la “inserción” y “delección” de algunos pb en la región central y 3’ de estos genes, que posiblemente podrían estar produciendo los cambios en el marco de lectura de estas proteínas hacia la región C-terminal. No obstante, también podría indicar una divergencia evolutiva entre éstas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, donde se habría conservado el dominio funcional ADH. Por ejemplo, la AdhE de *E. coli* de 891 residuos presenta actividades de ADH, ACDH y PFL, lo que parece ser un producto de fusión evolutivo, ya que las ADHs típicas descritas, tanto en eucariontes como bacterias, tienen alrededor de 380 aminoácidos y las ACDHs cerca de 500 residuos (Goodlove y col., 1989)

La evidencia presentada confirma que el gen *aipI* de *S. typhi*, presenta en la región 5’ identidad a nivel de secuencia de DNA con los genes *adhE* de *E. coli* y *S. typhimurium*. A nivel de secuencia de aminoácidos, AipI presenta similitud con enzimas del tipo alcohol deshidrogenasas, según las actividades informadas para sus homólogas AdhE de *E. coli*, y EutE de *S. typhimurium*.

El siguiente paso fue entonces la construcción de la *S. typhi* mutante en el gen *aipI*. Para ello, se utilizó el vector suicida pNM2, el cual mediante un evento de "crossing over" y por recombinación homóloga con el alelo silvestre puede integrarse en el cromosoma de la bacteria (Miller y Mekalanos, 1988), generando transconjugantes ampicilina resistentes (TYT2006). En forma paralela, se construyó la cepa *S. typhimurium adhE::pNM2* (NPM1), con una mutación similar a la de *S. typhi*, con el fin de determinar el efecto de dicha mutación en ensayos de virulencia *in vivo*.

Previamente, se realizó el análisis de los DNAs cromosomales de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*, mediante experimentos de hibridación Southern, el cual utilizó el fragmento génico *aipI* obtenido por PCR, como sonda. Los resultados, permitieron demostrar la presencia de una copia de este gen en cada especie.

La inserción del plasmidio pNM2 en el gen cromosomal deseado, *aipI* de *S. typhi* o *adhE* de *S. typhimurium*, se verificó entonces por hibridación Southern. Los DNAs cromosomales de las cepas silvestres *S. typhi* y *S. typhimurium* y de las mutantes correspondientes, TYT2006 y NPM1, digeridos con *EcoRI* e hibridados con la sonda *aipI*, permitió verificar que en ambos casos la inserción del vector suicida pNM2 había ocurrido en el gen blanco, debido a que este evento modificó la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA de las cepas mutantes con respecto al de las cepas silvestres. Se analizó además, el cromosoma de *S. typhi* TYT2006 con una combinación de enzimas, lo que corroboró también el cambio de los perfiles de restricción entre la cepa silvestre y mutante, debido a la modificación del locus *aipI* silvestre.

Una vez realizada la caracterización preliminar de las mutantes, se investigó su capacidad de entrar y proliferar en la línea celular epitelial humana, HEP-2. Se ha demostrado que el uso de cultivos de células es un modelo muy conveniente para el estudio cuantitativo de las interacciones entre distintas especies de *Salmonella* y células eucariontes. Entonces, el estudio del fenotipo invasor de las mutantes TYT2006, TYT2010 y NPM1 se ensayó sobre células epiteliales HEP-2 (Lissner y col., 1983). Además, se introdujo como control la cepa *S. typhi* *ims50::Tn10* (TYT2010), mutante en un gen con similitud a la alcohol deshidrogenasa (Bäumler y col., 1994), con el objeto de descartar que *aipI* de *S. typhi* sea el gen *eutE*, previamente identificado en *S. typhimurium* (Stojiljkovic y col., 1995). El gen *eutE*, presenta 52 % de identidad a nivel de secuencia de DNA con el gen *adhE* de *E. coli*, pero a nivel de secuencia de aminoácidos presenta sólo similitud con la región N-terminal de la proteína AdhE. La mutación de *eutE*, resulta en una *S. typhimurium* atenuada en el ratón, por lo tanto, la comparación del efecto de ambas mutaciones *in vivo*, permitiría verificar parcialmente la identidad de *aipI*.

S. typhi aipI (TYT2006) mostró un índice de invasión de un 4 % del de la cepa parental *S. typhi* Ty2 (100 %), lo que implica una drástica disminución de la capacidad invasiva de la cepa mutante. Por el contrario, la cepa *S. typhimurium* NPM1, portadora de una mutación similar, no resultó afectada en su fenotipo invasor. La cepa TYT2010, tampoco se vió afectada, ya que mostró un índice de invasión de 113 %. Esta evidencia experimental apunta a que los genes *aipI* y *adhE* de *S. typhi* y *S. typhimurium*, respectivamente, no tendrían el mismo rol en ambas especies. Por otra parte, la mutación *ims50::Tn10* (*eutE::Tn10*) (Bäumler y col., 1994; Stojiljkovic y col., 1995) en *S. typhi*

no tiene el mismo impacto sobre la invasividad de la bacteria comparada con la mutación *aipI*::pNM2, lo que demuestra que estos genes con similitud a alcohol deshidrogenasa son diferentes.

El análisis en geles unidimensionales de las proteínas de la ME de la mutante *S. typhi* TYT2006, demostró la ausencia de la proteína AipI de 100 kDa, blanco de la mutación. Más aún, la mutación de *aipI* también afectó otras proteínas mayoritarias de la ME. Por ejemplo, OmpF no se detecta en aerobiosis y OmpC se observa claramente disminuída en anaerobiosis, condición en que además se detecta la aparición de una banda de proteína de alto peso molecular, de alrededor de 150 kDa. Este estudio se complementó con un análisis preliminar de las proteínas en geles bidimensionales. En las muestras aisladas de *S. typhi*, se observó un "spot" de proteína de 100 kDa fuertemente inducido en anaerobiosis, el cual correspondería a la proteína AipI (pI 6,4). En la cepa mutante TYT2006, no se detectó esta proteína de 100 kDa, en ninguna de las condiciones de cultivo. Estos resultados sugieren que, AipI no se expresa en la mutante TYT2006, tal como se había detectado en los geles unidimensionales. Más aún, el observar detenidamente los cambios en el perfil de proteínas en geles bidimensionales en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico, comparado con los obtenidos para la cepa silvestre, permite confirmar en forma cualitativa el efecto pleiotrópico de la mutación, la cual se manifiesta como alteraciones en la posición, expresión y represión de ciertas proteínas de la ME.

Estos resultados sugieren, que la interrupción del *aipI* también afecta la expresión o localización de otras proteínas de la ME. Ahora, si la disminución de la capacidad invasiva de la cepa TYT2006 se debe sólo al efecto pleiotrópico de la

mutación sobre otras proteínas de la ME en general o a la inactivación de *aipI* por si misma, necesita de nuevas investigaciones para ser respondida. Por ejemplo, no se puede descartar que la mutación afecte indirectamente la presencia de una proteína esencial de superficie o que pueda afectar indirectamente la correcta respuesta de la célula hospedera o bien, que la inserción del vector suicida pNM2 en el cromosoma de *S. typhi* pudiera tener un efecto polar sobre la expresión de otros genes. Por ejemplo, el análisis de las secuencias de DNA que flanquean al gen *adhE* en *E. coli* K-12, permitió identificar un orf putativo (*bl240*) con similitud a la secuencia de inserción IS4, el cual se inicia dentro de la región 3' del gen *adhE*. Este hecho resulta muy inetrasante, ya que las IS se han asociado a las SPI y transferencia horizontal de genes virulentos. Es posible, que en *S. typhi*, exista una región homóloga, que pudiera estar dando cuenta de la pérdida de virulencia, porque la inserción del vector pNM2 sea polar.

Por el contrario, la mutación del gen *adhE* de *S. typhimurium* (NPM1) no alteró tan drásticamente el perfil de proteínas de la ME, comparado con el de la cepa parental *S. typhimurium* 14028s. Más aún, la cepa NPM1 no resultó significativamente atenuada en el ratón al ser administrada por la ruta oral, corroborando que la *S. typhimurium* mutante no presenta defectos para la invasión del epitelio intestinal (Galán, 1996).

Esta evidencia es muy importante, ya que estaría indicando que ambas proteínas, AipI de *S. typhi* y AdhE de *S. typhimurium*, que nosotros presumimos "similares", no tienen la misma función en la ME de cada una, quizá son específicas y diferentes para cada especie.

Uno de los puntos importantes en la caracterización genética de una bacteria se refiere a la transferencia de una mutación desde la bacteria mutante a otra con genoma

silvestre (backcross), para así verificar que el fenotipo observado en la mutante está directamente relacionado con la mutación en estudio. Esta estrategia es fácilmente realizable cuando se cuenta con fagos transductores que permiten hacer esta transferencia en una sola etapa. Este no es el caso para *S. typhi*, ya que no se dispone de esta valiosa herramienta genética. En general, para *S. typhi* no se cuenta con una estrategia experimental de rutina que permita transferir cualquier marcador cromosomal a otra *S. typhi*. Se probó el método descrito por Toro y col., (1998a) y se logró transferir la mutación *aipl::pNM2* desde *S. typhi* TYT2006 directamente a una *S. typhi* silvestre, transformándola con el DNA cromosomal de la mutante. El estudio del fenotipo invasor de la cepa "backcross", *S. typhi* TYT2007, mostró un índice de invasión de 50 %. Hecho difícil de explicar, pero se podría pensar en una mutación supresora, que permite recuperar sólo parcialmente el fenotipo silvestre, o bien, que algún mecanismo aún desconocido, permite la inserción del vector suicida en otra región del cromosoma de *S. typhi*, lo que le confirió el fenotipo de resistencia a ampicilina a la cepa backcross.

A pesar de que AipI presenta similitud a una alcohol deshidrogenasa, no se pudo detectar esta actividad enzimática en el citoplasma de *S. typhi* Ty2, ni tampoco identificar mutantes resistentes al sustrato suicida alilalcohol, según los métodos descritos para *E. coli* (Lorowitz y Clark, 1982; Clark y Cronan, 1980). Sin embargo, si se pudo determinar que *S. typhi* es mucho más sensible al alilalcohol al ser cultivada en anaerobiosis, comparada con las concentraciones letales descritas para *E. coli* cultivadas en anaerobiosis. Incluso, las cepas de *S. typhimurium* analizadas, se presentaron más parecidas en resistencia al alilalcohol y actividad enzimática citoplasmática a *E. coli* que a *S. typhi*. Esta alta sensibilidad a alilalcohol y la ausencia de actividad alcohol

deshidrogenasa en el citoplasma de la bacteria, podría estar relacionada a la presencia de AipI en la ME de *S. typhi*, lo que afectaría más drásticamente la viabilidad de la bacteria.

En las mutantes TYT2006 y NPM1, no se detectó cambios metabólicos importantes con respecto a las cepas parentales silvestres, así como tampoco diferencias significativas en las curvas de crecimiento realizadas en condiciones de cultivo aeróbico y anaeróbico. Tampoco se pesquizaron cambios en la composición y tamaño del LPS. Por lo tanto, se puede suponer que la disminución de la capacidad invasiva de la bacteria no se debe a defectos de crecimiento, motilidad, utilización de nutrientes o cambios en las permeabilidad de la ME debido a un LPS deficiente, según los antecedentes encontrados en la literatura (Baker y col., 1999). Donde se ha informado que ciertas alteraciones del LPS pueden afectar la composición y estabilidad de la ME de bacterias Gram negativas (Nikaido, 1994), así como también de que el rol del LPS en la invasividad de *Salmonella* varía entre las especies. Por ejemplo, se sabe que un LPS completo es requerido para la invasión de células epiteliales por *S. choleraesuis* (Finlay y col., 1988) y *S. typhi* (Mroczenski-Wildey y col., 1989). Por el contrario, resultados de nuestro laboratorio apuntan a que sólo sería esencial para la invasión del macrófago (Contreras y col., 1995b).

En un intento por obtener mayor información acerca de la localización subcelular de AipI en *S. typhi*, se realizó estudios de inmunomicroscopía electrónica de transmisión con anticuerpos policlonales anti AipI obtenidos en nuestro laboratorio.

Primero se ensayó los anticuerpos policlonales anti AipI, en cuanto a su inmuno reactividad contra las proteínas de la ME de *S. typhi* en experimentos Western blot (Towbin y Godpon, 1979). El suero policlonal mostró dos bandas de reacción positiva.

Una de alrededor de 100 kDa, correspondiente a AipI, sólo en la fracción de ME de bacterias crecidas en anaerobiosis y la otra, a la altura de 50 kDa (flagelina). Por el contrario, el perfil de proteínas de la cepa mutante *S. typhi aipI* (TYT2006) crecida en anaerobiosis no presentó la banda de reacción de 100 kDa, pero sí una señal positiva de menor peso molecular, de alrededor de 95 kDa. Esta evidencia experimental, indica que la cepa mutante TYT2006, ha sufrido un cambio en la estructura y composición de la ME. Ahora bien, que es específicamente lo que ocurre y como, necesita de mayores estudios para ser respondido. Mediante inmunomicroscopía electrónica, usando el suero policlonal fabricado, no se pudo obtener información concreta. Los anticuerpos no fueron capaces de reconocer los antígenos en los cortes de las bacterias, debido quizá a la falta de conservación del tejido, la cual debe ser óptima para la inmuno reacción. Mediante microscopía de inmunofluorescencia con bacterias vivas, se pudo detectar, en un ensayo preliminar, gran número de marcas fluorescentes en la superficie de *S. typhi* crecida en anaerobiosis, las cuales se encontraron en mucho menos cantidad en la mutante TYT2006.

En resumen, esta es la primera información que existe acerca de la localización subcelular de la proteína AipI, AdhE u otras proteínas con homología a alcohol deshidrogenasa en *S. typhi*. Hasta el momento nuestros resultados demuestran que AipI es una proteína fuertemente inducida en anaerobiosis, insoluble en Triton X-100, se encuentra en forma abundante en la ME, su mutación disminuye drásticamente la capacidad invasiva de la bacteria a células HEp-2 en cultivo y que su mutación tiene además un efecto "pleiotrópico" sobre otras proteínas de la membrana. No obstante, aunque es posible que AipI se asocie a la membrana externa al momento de romper las

bacterias, no parece posible que una proteína citoplasmática se pueda localizar cuantitativamente en la fracción de ME luego del tratamiento con detergente. Por ello, se propone que AipI se induce en condiciones de crecimiento anaeróbico y llega a la ME de *S. typhi* de alguna manera aún no descrita para ejercer quizá un rol estructural o regulatorio sobre otras proteínas de la ME, necesarias para la invasión de células epiteliales en cultivo. El análisis del ORF que codificaría AipI, no presenta un péptido señal, necesario para la exportación de la mayoría de las proteínas de membrana mediante el sistema tipo II o *sec*. Sin embargo, se sabe que el sistema de secreción tipo III, dependiente de contacto, descrito en *S. typhi* y *S. typhimurium*, así como en otros patógenos de animales y plantas, no los utiliza (Collazo y Galán, 1997; Lee, 1997), ya que las proteínas son directamente translocadas desde el citoplasma bacteriano hacia la ME y medio extracelular.

Existe cierto precedente de la localización de alcohol deshidrogenasas en la membrana de algunas bacterias. Por ejemplo, en la fracción de membrana de *Lactobacillus fermentum* se encontró ciertas estructuras espirales filamentosas finas, que fueron denominadas espirosomas, las que más tarde fueron descritas en *E. coli* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Nomura y col., 1989). La digestión proteolítica del espirosoma, demostró que estaba compuesto por una sola proteína, denominada espirosina, de peso molecular aparente de 95 kDa, que además presentaba actividad alcohol deshidrogenasa (Nomura y col., 1989). El espirosoma también se identificó en *Yersinia enterocolitica*, donde se le encontró tanto en el citoplasma como en la fracción de membrana de la bacteria (Yamato y col., 1994) y en *E. coli*, donde esta partícula proteica polimérica codificada por el gen *adhE* presenta actividad del tipo

deshidrogenasa (Yamato y col., 1997). Se han hecho numerosas y variadas especulaciones acerca del aspecto funcional del espirosoma, no obstante, aún no se encuentra una función específica a esta estructura filamentosa. La más extensivamente estudiada ha sido la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli*, enzima citoplasmática, central en el metabolismo fermentativo de la bacteria, la cual presenta actividad de alcohol deshidrogenasa, piruvato-formato liasa-desactivasa y acetil-CoA reductasa, que juega un importante pero no definido rol en el metabolismo anaeróbico (Leonardo y col., 1996).

Otro caso, corresponde a la alcohol deshidrogenasa CgsA, localizada en la superficie de *Myxococcus xanthus*, esencial para la comunicación célula-célula (C-signaling), durante el desarrollo del cuerpo frutoso de ésta (Lee y Shimkets, 1996). CgsA es el primer miembro de la familia SCAD (short-chain alcohol dehydrogenase), que se encuentra asociado a la superficie celular y claramente involucrado en un nuevo tipo de sistema de señalización táctil. CgsA al ser comparado con otros miembros de la familia SCAD, mostró similitud (50,7 % similitud, 27 % identidad) con una alcohol deshidrogenasa de *E. coli* (P15047) y otras enzimas que utilizan acil-sustratos, como la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa dependiente de NADPH y NADH humana, P15428 y P16152, respectivamente. Éstas últimas involucradas en la iniciación del proceso de degradación de prostaglandinas (Lee y Shimkets, 1996), las cuales se sabe participan en los procesos de comunicación entre células animales.

La estrategia experimental alternativa, que se utilizó para de obtener *S. typhi* Ty2 mutantes en proteínas de la ME inducidas en anaerobiosis, implicó la mutagénesis de la bacteria mediante el transposón *TnphoA*. De las alrededor de 4000 mutantes *S.*

typhi::TnphoA obtenidas, 32 resultaron intensamente azules (XP^+). De éstas fusiones génicas, 12 fueron inducidas por la condición ambiental anaeróbica y 7 de ellas presentaron defectos para la invasión de células epiteliales HEP-2. En todos los casos, el índice de invasión fue menor al 50 % del de la cepa control *S. typhi phoN* (TYT1415), demostrando que en general, las proteínas de superficie o extracelulares de *S. typhi* tienen un importante papel en el contacto e invasión de las células epiteliales. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la inserción del transposón *TnphoA*, origine una mutación polar (Leclerc y col., 1998), que afecte indirectamente la expresión de proteínas involucradas en invasión. También se ha informado de la existencia de fenotipos defectuosos en adherencia e invasión en *S. typhi*, que estarían relacionados con un efecto tóxico, no específico, debido a la expresión de una fusión $PhoA^+$ activa, lo que podría estar bloqueando la vía de exportación de otras proteínas necesarias para la invasión (Leclerc y col., 1998).

Más aún, el análisis de la composición de las proteínas de la ME de las mutantes defectuosas en invasión, en geles unidimensionales teñidos con azul de Coomassie, permitió detectar sólo dos mutantes (TYT1979 y TYT1981) con un perfil de proteínas alterado. Esto podría significar que este método de análisis de proteínas no es lo suficientemente sensible y que sólo detecta cambios en proteínas que se expresan en forma abundante en la ME. Sorprendentemente, la mutante TYT1979, mostró la ausencia de una proteína de alrededor de 100 kDa en anaerobiosis, al parecer correspondiente a AipI. No obstante, la falta de AipI en esta cepa no afectó otras proteínas de la ME, como se observó en la mutante *S. typhi* TYT2006. Pero si disminuyó drásticamente el fenotipo invasor de la bacteria, la cual mostró un índice de invasión de

14 %. La mutante TYT1981, que no presentó actividad de fosfatasa alcalina en anaerobiosis, se introdujo como control en estos ensayos, para ver el efecto de una mutación que afectaba completamente la inducción de genes anaeróbicos (posiblemente en un gen regulador) con respecto a otras, donde hay inducción de ellos. En este caso, el perfil de proteínas de la ME de *S. typhi* TYT1981 cultivada en aerobiosis se mostró igual al de la cepa crecida en anaerobiosis, donde claramente no se observó la fuerte inducción de las proteínas de 100, 80 y 46 kDa en anaerobiosis, así como tampoco la expresión de OmpF en aerobiosis. Esta mutante al parecer porta una mutación en un gen regulado por anaerobiosis, ya que su ausencia afecta la inducción de ciertas proteínas de la ME en anaerobiosis. Por otro lado, también disminuye significativamente el fenotipo invasor de ésta, alcanzando sólo un 4 % del de la cepa parental. Este resultado, contribuye con importante evidencia a nuestra hipótesis, de que la potenciación del fenotipo invasor de *S. typhi* en anaerobiosis se debe a la inducción de ciertas proteínas de la ME.

La obtención de la mutante TYT1979 como de la TYT1981, proveen de una importante herramienta de estudio, que junto a la mutante TYT2006, permitirán continuar con esta línea de investigación, con el objeto de establecer el papel de AipI en la ME, su regulación en anaerobiosis y su función en el mecanismo molecular de invasión de células HEp-2 en cultivo.

Es importante enfatizar que ninguna línea de células en cultivo reproduce el medio ambiente natural que encuentra la bacteria durante la interacción con su hospedero. Sin embargo, han resultado muy útiles para identificar factores tanto bacterianos como celulares implicados en etapas clave de la infección (Galán, 1996, Bliska y col., 1993; Isberg y Van Nhieu, 1994).

Este trabajo contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogenicidad de *S. typhi*. En general, todos los progresos alcanzados en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de *S. typhi* han estado siempre vinculados a los estudios y descubrimientos hechos en *S. typhimurium*, debido principalmente a lo limitado de las herramientas genéticas disponibles y a la falta de un animal-modelo adecuado de estudio. Así, la relación *S. typhimurium*-ratón ha sido el modelo tradicional de trabajo para el entendimiento de la relación *S. typhi*-hombre. Sin embargo, en vez de las obvias similitudes aparentes entre ambas enfermedades (fiebre tifoidea), muchos mecanismos a nivel molecular y celular que ahora se conocen, apuntan a que *S. typhi* y *S. typhimurium* llevan a cabo la infección de su hospedero de diferentes maneras. Por ejemplo, *S. typhi* no posee un plasmidio que contenga genes involucrados en virulencia como lo tiene *S. typhimurium*, ni tampoco posee genes similares a ellos presentes en su cromosoma. Más aún, la transformación de *S. typhi* con el plasmidio virulento de *S. dublin*, no produjo transformantes virulentas para el ratón (Roudier y col., 1990). Otras diferencias, potencialmente importantes, han sido descritas a nivel del orden de los genes cromosomales de *S. typhimurium* y *S. typhi*. En *S. typhi* hay inversiones y transposiciones en los siete segmentos de DNA existentes entre los siete operones *rrn* para RNA. Además, existen al menos tres inserciones, una de 118 kbp. De acuerdo a los autores, estos rearrreglos cromosomales detectados en *S. typhi* Ty2 y algunas cepas silvestres, tienen un rol en virulencia (Liu y Sanderson, 1995). Por otra parte, no se ha detectado rearrreglos ligados a los genes *rrn* en cepas silvestres de *S. typhimurium* (Liu y Sanderson, 1995).

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis, nuevamente apuntan a que *S. typhi* y *S. typhimurium*, poseen mecanismos de patogenicidad diferentes, donde claramente la mutación de AipI en *S. typhi*, no tuvo el mismo impacto que la inactivación de AdhE en *S. typhimurium*. Es posible que AipI, tenga que ver con el alto grado de adaptación de *S. typhi* a su único hospedero natural conocido, el hombre. Sin lugar a duda, este aporte al conocimiento de los mecanismos empleados por esta bacteria para producir enfermedad, permitirá en un futuro próximo desarrollar estrategias más eficientes de control y prevención de la fiebre tifoidea.

7. CONCLUSIONES

1) En anaerobiosis se inducen algunas proteínas de la ME de *S. typhi* Ty2, ellas son: AipI, Flagelina, porina MalL y porina PhoE.

2) AipI presenta similitud con la alcohol deshidrogenasa AdhE de *E. coli* y *S. typhimurium*. Constituyéndose en la primera proteína de este tipo descrita en *S. typhi*.

3) AipI es insoluble en Triton X-100, se encuentra en la fracción de ME de *S. typhi* y al parecer cumple un rol estructural o regulatorio sobre otras proteínas de la membrana.

4) AipI es necesaria para la invasión de células epiteliales HEP-2 en cultivo.

5) AipI de *S. typhi* y AdhE de *S. typhimurium* no cumplen la misma función, ya que la mutación de estas proteínas "símiles" no tiene el mismo efecto sobre el fenotipo de cada cepa.

6) La proteína de 20 kDa no mostró similitud con otras proteínas bacterianas descritas a la fecha, lo que sugiere quizá la detección de una proteína específica de *S. typhi*.

7) *S. typhi* mutantes en otras proteínas de superficie, reguladas por anaerobiosis, también presentan defectos para la invasión de células epiteliales HEP-2 en cultivo.

8. BIBLIOGRAFIA

Altmeyer, R., Mc Nera, J., Bossio, J., Rosenshine, J., Finlay, B., y Galán, J. (1993) Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **7**: 89-98.

Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, Miller, W. y Lipman, D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., y Lipman, D. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P. S. y Popoff, M. Y. (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol. Microbiol.* **29**(3):835-850.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K. (1992) Short protocols in Molecular Biology. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Bajaj, V., Hwang, C., y Lee, C.A. (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* **18**:715-727.

Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., y Lee, C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**(4):703-714.

Baker, S., C. Daniels, y R. Morona. (1997) Phop/Q regulated genes in *Salmonella typhi*: identification of melittin sensitive mutants. *Microb. Pathogen.* **22**: 165-179.

Baker, S. J., Gunn, J. S., y Morona, R. (1999) The *Salmonella typhi* melittin resistance gene *paqB* affects intracellular growth in PMA-differentiated U937 cells, polymyxin B resistance and lipopolysaccharide. *Microbiol.* **145**:367-378.

Bauer, K., Benz, R., Brass, J., y Boos, W. (1985) *Salmonella typhimurium* contains an anion-selective outer membrane porin induced by phosphate starvation. *J. Bacteriol.* **161**(2):813-816.

Bäumler, A.J., Kusters, J.G., Stojilkovic, I., y Heffron, F. (1994) *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect. Immun.* **62**(5):1623-1630.

- Bäumler, A. J. (1997) The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends Microbiol. **5**(8):318-322.
- Behlau, I. y Miller, S. I. (1993) A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. J. Bacteriol. **175**:4475-4484.
- Birnboim, H.C., y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**:1513-1523.
- Blanc-Potard, A., y Groisman, E. (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. EMBO J. **16**: 5376-5385.
- Bliska, J. B., Galán, J., y Falkow, S. (1993) Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. Cell **73**: 903-920.
- Bradburne, J. A., Godfrey, P., Choi, J. H., y Mathis, J. M. (1993) *In vivo* labeling of *Escherichia coli* cell envelope proteins with N-Hydroxysuccinimide esters of Biotin. Appl. Environ. Microbiol. **59**(3):663-668.
- Burchard, R. P., y Bloodgood, R. A. (1990) Surface proteins of the gliding bacterium *Cytophaga* sp. Strain U67 and its mutants defective in adhesion and motility. J. Bacteriol. **172**(6):3379-3387.
- Calva, E., y Puente, J. L. (1995) *S. typhi* outer membrane proteins: their roles in typhoid fever. South East J. Tropical Medicine and Public Health **26**:138-144.
- Clark, D., y Cronan, J. R. (1980) *Escherichia coli* mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. J. Bacteriol. **141**(1):177-183.
- Clark, C. y Gyles, C. (1986) Galactose epimerase mutants of *Salmonella typhimurium* as live vaccines for calves. Can. J. Vet. Res. **50**:165-173.
- Collazo, C., y Galán, J.E. (1997) The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sips proteins into the host cell. Mol. Microbiol. **24**: 747-756.
- Contreras, I. (1994) Efecto de la anaerobiosis sobre la capacidad de *Salmonella typhi* de penetrar y proliferar en células humanas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Contreras, I., Muñoz, L., Toro, C. S., y Mora, G.C. (1995a). Heterologous expression of *Escherichia coli* porin genes in *Salmonella typhi* Ty2: regulation by medium osmolarity, temperature and oxygen availability. FEMS Microbiol. Lett. **133**:105-111.

Contreras, I., Obreque, V.H., Blanco, L.P., Toro, C.S., y Mora, G.C. (1995b) Anaerobically induced *Salmonella typhi* genes are involved in entry to and proliferation within human-derived cell lines. South East J. Tropical Medicine and Public Health 26:110-117.

Contreras, I., Toro, C. S., Troncoso, G., y Mora, G.C. (1997) *Salmonella typhi* mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. Microbiol. 143:2665-2672.

Cornelis, G., Sluiter, C., Lambert de Rouvroit, C., y Michiels, T. (1989a) Homology between VirF, the transcriptional activator of *Yersinia* virulence regulon and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. J. Bacteriol. 171:254-262.

Cornelis, G., Biot, T., Lambert de Rouvroit, C., Michiels, T., Mulder, B., y col. (1989b) The *Yersinia yop* regulon. Mol. Microbiol. 3: 1455-1459.

Elsinghorst, E., Baron, L., y Kopecko, D. (1989) Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5173-5177.

Ernst, R.K., Dombroski, D.M., y Merrick, J.M. (1990) Anaerobiosis, type I fimbriae and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 58:2014-2016.

Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., y Heffron, F. (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5189-5193.

Finlay, B. B., Starnbach M. N. y Francis C. L. (1988) Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. Mol. Microbiol. 2:757-766.

Finlay, B. y Falkow, S. (1989) *Salmonella* as an intracellular parasite. Mol. Microbiol. 3: 1833-1841.

Furman, M., Fica, A., Saxena, M., Di Fabio, J. L., y Cabello, F. C. (1994) *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. Infect. Immun. 62(9): 4091-4094.

Galán, J.E. (1996) MicroReview: Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. Mol. Microbiol. 20(2):263-271.

Galán, J. E., y Curtiss III, R. (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6383-6387.

- Galán, J. E., y Curtiss III, R. (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**: 1879-1885.
- Galán, J. E., y Curtiss III, R. (1991) Distribution of *invA*, *-B*, *-C*, and *-D*, genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* **59**: 2901-2908.
- García del Portillo, F., y Finlay, B. (1994) *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect. Immun.* **62**: 4641-4645.
- Giannella, R. A., Washington, O., Gemski, P., y Formal, S. B. (1973) Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*. A model for study invasiveness of *Salmonella*. *J. Inf. Dis.* **128**:69-75.
- Gennis, R. B., y Stewart, V. (1996) Energy production. Respiration. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, 2nd edn, pag. 217-261. Editada por F. C. Neidhardt. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Ginocchio, C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., y Galán, J.E. (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**:717-724.
- Ginocchio, C., Pace, J. y Galán, J. (1992) Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of *Salmonellae* into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5976-5980.
- Goodlove, F. E., Cunningham, P. R., Parker, J., y Clark, D. P. (1989) Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene* **85**:209-214.
- Groisman, E., y Ochman, H. (1994) How to become a pathogen. *Trends Microbiol.* **2**: 289-293.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mulhordfer, I., y Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Heithoff, D., Conner, C., Hanna, P., Julio, S., Hentschel, U., y Mahan, M. (1997) Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 934-939.
- Hermant, D., Ménard, R., Arricau, N., Parsot, C., y Popoff, M. Y. (1995) Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **17**(4):781-789.

Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A-C., Miller, M. J., y Merrill, C. R. (1988) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**:424-435.

Hone, D., Attridge, S., Forrest, B., Morona, R., Daniels, D., Labrooy, J., Chiron, R., Bartholomeusz, A., Skearman, D., y Hackett, J. (1988) A *galE* *via* (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect. Immun.* **56**: 1326-1333.

Hong, K. H. y Miller, V. L. (1998) Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J. Bacteriol.* **180**(7):1793-1802.

Hudson, C. y Hay, F. C. (1980) Antisera. En: "Practical Immunology". 2º Edición. Blackwell Scientific Publications. pp8.

Isberg, R., y Falkow, S. (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* **317**:262-264.

Isberg, R., Voorhis, D., y Falkow, S. (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate culture mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778.

Isberg, R. R., y Van Nhieu, G. T. (1994): Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **27**: 395-422.

Janssen, R., Verjans, G. M., Kusters, J. G., y Tommassen, J. (1995) Induction of the *phoE* promoter upon invasion of *Salmonella typhimurium* into eukaryotic cells. *Microb. Pathog.* **19**(4):193-201.

Johnston, C., Pegues, D. A., Hueck, C. J., Lee, C. A., y Miller, S. I. (1996) Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol. Microbiol.* **22**(4):715-727.

Jones, B. D., (1996). Salmonellosis: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:533-61.

Jones, B.D., y Falkow, S. (1994) Identification and Characterization of a *Salmonella typhimurium* Oxygen-Regulated Gene required for Bacterial Internalization. *Infect. Immun.* **62**(9):3745-3752.

Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., y Galán, J., (1995) Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry cultured epithelial cells. *J. Bacteriol.* **177**: 3965-3971.

Kohbata, S., Yokoyama, Y. y Yabuuchi, E. (1986) Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol. Immunol.* **30**: 1225-1237.

- Laemmli, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- Leclerc, G. J., Tartera, C., y Metcalf, E. (1998) Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect. Immun.* **66**(2):682-691.
- Lee, C. A. (1997) Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol.* **5**(4):148-156.
- Lee, C. A., Jones, B. D., y Falkow, S. (1992) Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection of hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1847-1851.
- Lee, C.A. y Falkow, S. (1990) The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4304-4308.
- Lee, K., y Shimkets, L. J. (1996) Suppression of a signaling defect during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **178**(4):977-984.
- Leonardo, M.R., Cunningham, P.R., y Clark, D.P. (1993) Anaerobic regulation of the *adhE* gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**(3):870-878.
- Levine, M. M., Taylor, D. N., y Ferreccio, C. (1989) Typhoid vaccines come of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:374-381.
- Lissner, C.R., Swanson, R. N., y O' Brien, A. D. (1983) Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in vitro*. *J. Immunol.* **131**:3006-3013.
- Liu, S-L, Ezaki, T., Miura, H., Matsui, K., y Yabuuchi, E. (1988) Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect. Immun.* **56**:1967-1973.
- Liu, S-L. y Sanderson, K. E. (1995) Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1018-1022.
- Lobos, S.R., y Mora, G.C. (1991) Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **12**:448-450.
- Lorowitz, W., y Clark, D. (1982) *Escherichia coli* with temperature-sensitive alcohol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **152**(2):935-938.
- Maloy, S. R. (1990) *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Jones and Barlett Publishers. Boston.

Maurelli, A. (1992) *Shigella* inside and out: lifestyle of the invasive and enteric. ASM 58: 603-608.

Maurelli, A., y Sansonetti, P. (1988) Identification of chromosomal gene controlling temperature regulated expression the *Shigella* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2820-2824.

Manoil, C., y Beckwith, J. (1985) *TnphoA*, a transposon probe for protein export signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8129-8133.

Meyer, J.E.W., Hofnung, M., y Schulz, G. E. (1997) Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. J. Mol. Biol. 266:761-775.

Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in Bacteria. J. Bacteriol. 174:1-7.

Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J-M., y Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. Infect. Immun. 58(9):2840-2849.

Miller, V. y Falkow, S. (1988) Evidence for two loci genetic from *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect. Immun. 56:1242-1248.

Miller, V. L., y Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 170(6):2575-2583.

Miller, S., Kukral, A., y Mekalanos, J. (1991) A two-component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5054-5058.

Mills, S.D. y Finlay, B.B. (1994) Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. Microb. Pathog. 17: 409-423.

Mroczenski-Wildey, M., Di Fabio, J., y Cabello, F. (1989) Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of lipopolysaccharide. Microb. Pathog. 6: 143-152.

Nikaido, H. (1994) Isolation of outer membranes. Methods Enzymology 235:225-252.

Nomura, S., Masuda, K., y Kawata, T. (1989) Comparative characterization of Spirosomes isolated from *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus buchneri*. Microbiol. Immunol. 33(1):23-34.

- O'Callaghan, D., y Charbit, A. (1990) High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **223**:156-158.
- O'Connor, D. C., Farris, M., Fowler, R., y Qi, S.-Y. (1997). The proteome of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: Current progress on its determination and some applications. *Electrophoresis* **18**:1438-1490.
- O'Farrell, P.H. (1975) High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **250**(10):4007-4021.
- Pace, J., Hayman, J., y Galán, J. (1993) Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. *Cell* **72**: 505-514
- Pang, T. (1998) Genetic dynamics of *Salmonella typhi*-diversity in clonality. *Trends Microbiol.* **6**(9):339-342.
- Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I., y Miller, S.I. (1995) PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol. Microbiol.* **17**(1):169-181.
- Penheiter, K.L., Mathur, N., Giles, D., Fahlen, T., y Jones, B.D. (1997) Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol. Microbiol.* **24**(4):697-709.
- Peterson, P. K., y Quie, P. G. (1981) Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious diseases. *Ann. Rev. Med.* **32**: 29-43.
- Pluskal, M. G., Przekop, M. B., y Kavonian, M. R. (1986) Immobilon™ PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for Western blotting of proteins. *BioTechniques* **4**(3):272-283.
- Pulkkinen, W. S., y Miller, S. I. (1991): A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **173**:86-93.
- Qi, S.-Y., Moir, A., y O'Connor, D. (1996) Proteome of *Salmonella typhimurium* SL1344: Identification of novel abundant cell envelope proteins and assignment to two-dimensional reference map. *J. Bacteriol.* **178**(16):5032-5038.
- Reed, K. A., Clark, M. A., Booth, T. A., Hueck, C. J., Miller, S. I., Hirst, B. H. y Jepson, M. A. (1998) Cell-contact-stimulated formation of filamentous appendages by *Salmonella typhimurium* does not depend on the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island I. *Infect. Immun.* **66**(5):2007-2017.
- Reed, L. J., y Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *A. Hyg.* **27**(3):493-497.

Roudier, C., Krause, M., Fierer, J., y Guiney, D. (1990) Correlation between the presence of sequences homologous to the *vir* region of *Salmonella dublin* plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two *Salmonella* serotypes in mice. *Infect. Immun.* **58**: 1180-1185.

Salyers, A. A. y Whitt, D. D. (1994) *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach*. 1st ed. ASM Press, Washington, D. C.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanderson, K. E., Hessel, A., y Rudd, K. E. (1995) Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII. *Microbiol. Rev.* **59**(2):241-303.

Schiemann, D.A., y Shope, S.R. (1991) Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells *in vitro* and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.* **59**:437-440.

Schnaitman, C.A. (1971) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* **108**(1):545-552.

Selander, R. S., Beltran, P. y Smith, N. H. (1991) Evolutionary genetics of *Salmonella*. En: "Evolution at the molecular level". Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. pp 25-27.

Shea, J. E., Hensel, M., Gleesson, C., y Holden, D. W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2593-2597.

Slauch, J., Taylor, R. y Maloy, S. (1997) Survival in a cruel world: how *Vibrio cholerae* and *S. typhimurium* respond to an unwilling host. *Genes & Development* **11**: 1761-1774.

Spierings, G., Elders, R., van Lith, B., Hofstra, H., y Tommassen, J. (1992) Characterization of the *Salmonella typhimurium phoE* gene and development of *Salmonella*-specific DNA probes. *Gene* **122**:45-52.

Spiro, S., y Guest, J. (1991) Adaptative responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 310-314.

Stojiljkovic, I., Bäumlner, A. J., y Heffron, F. (1995) Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: Nucleotide sequence, protein expression and mutational analysis of the *cchA cchB eutE eutJ eutG eutH* gene cluster. *J. Bacteriol.* **177**(5):1357-1366.

Tartera, C., y Metcalf, E.S. (1993) Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect. Immun.* **61**(7):3084-3089.

Toro, C. S., Mora, G. C., y Figueroa-Bossi, N. (1998a) Gene transfer between related bacteria by electro-transformation: Mapping *Salmonella typhi* genes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **180**:4752-4759.

Toro, C. S. (1998b). Transferencia de genes entre bacterias relacionadas mediante electrotransformación. Aplicación en la caracterización genética de mutantes de *Salmonella typhi* con defectos en la capacidad de invadir células epiteliales. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Towbin, H. T. S., y Godpon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.

Wood, M., Rosqvist, R., Mullan, P., Edwards, M., y Galyov, E. (1996) SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* **22**: 327-338.

Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S., y Galyov, E. (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* **29**(3):883-891.

Wong, K-K., Mc Clelland, M., Stillwell, L. C., Sisk, E. C., Thurston, S. J., y Saffer, J. D. (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infect. Immun.* **66**: 3365-3371.

Yamato, M., Takahashi, Y., Tomotake, H., Ota, F., Hirota, K., y Yamaguchi, K. (1994) Monoclonal antibodies to Spirosin of *Yersinia enterocolitica* and analysis of the localization of spirosome by use of them. *Microbiol. Immunol.* **38**(3):177-182.

Yamato, M., Hayashi, M., Shiomoto, Y., y Ota, F. (1997) Quantitation by enzyme immunoassay of spirosin from *Lactobacillus reuteri* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* **152**(1):87-92.

Zahrt, T.C., Mora, G. C., y Maloy, S. (1994) Inactivation of mismatch repair overcomes the barrier to transduction between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **176**:1527-1529.

Zhou, D., Mooseker, M. S., y Galán, J. E. (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**:2092-2095.

Zierler, M., y Galán, J.E. (1995) Contact with cultured epithelial cells induces the secretion of the *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. Infect. Immun. 63:4024-4028.