

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Participación de los factores transcripcionales Fnr y
ArcA en la dinámica estructural dependiente de
oxígeno del lipopolisacárido y su impacto sobre la
virulencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctora en Bioquímica por:**

PAULINA ALEJANDRA FERNÁNDEZ OYARZÚN

**Directores de Tesis: Dr. Sergio Álvarez Armijo
Dr. Carlos Santiviago Cid**

Santiago-CHILE

Agosto 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

PAULINA ALEJANDRA FERNÁNDEZ OYARZÚN

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen público rendido el día

_____.

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez A.

Dr. Carlos Santiviago C.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

Dr. Gino Corsini

Dr. Carlos Jerez

Dr. Juan Carlos Salazar

AGRADECIMIENTOS

Cumplí doce años y medio como alumna de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y estoy profundamente agradecida de quienes la componen: académicos, funcionarios y estudiantes. En especial, agradezco a la comunidad del tercer piso del edificio Luis Núñez, a los profesores siempre amables, a los tesisistas dispuestos a ayudar y a colaborar, y a los funcionarios con enorme voluntad.

A los laboratorios que contribuyeron a la realización de esta tesis. Al Laboratorio de Biología de Sistemas del Dr. Francisco Chávez por permitirme trabajar con pez cebra y completar el tercer objetivo de mi tesis, y al Laboratorio de Bioquímica del Dr. Mauricio Báez por orientarme y facilitarme el equipamiento para la purificación de proteínas.

A la comisión evaluadora de esta tesis Doctores Alfonso Paredes, Gino Corsini, Carlos Jerez y Juan Carlos Salazar, por su atención en mi tesis, por siempre recalcar el lado positivo y generar instancias de discusión enriquecedoras para mi formación.

A mis compañeros del programa de Doctorado en Bioquímica, Evelyn, Ítalo, Pablo y Cristian por crear un ambiente de apoyo mutuo en lo personal y académico, y siempre optar por el camino del compañerismo.

A mis directores de tesis, Sergio y Cliff, por su dedicación, paciencia y sobretodo, por su comprensión y apoyo en los momentos que se volvieron pesados y difíciles de soportar. Muchas gracias por permitir que LabMicro sea el maravilloso lugar que es.

A LabMicro, mis hermanos, hijos, nietos, mascotas, etc. A Héctor, Andrea, Kamo, Jimmy, Chinchí, Ítalo, Bea, BayBay, Feña, Morgan y Negro, no les quiero agradecer por separado, porque lo más importante de LabMicro para mí es lo que pudimos construir todos juntos, un lugar de verdadero compañerismo (y a veces de bullying). No sé cómo hubiese terminado mi tesis sin su apoyo y amistad. Por lejos, son lo más lindo que me llevo de esta etapa.

Al ejercito rojo, a Cony, Héctor (de nuevo), Amparo, Jimmy (de nuevo), Cometa, Chinchí (de nuevo) y Marce por tener la paciencia de entenderme, seguir mi estructura mental y hacer experimentos que muchas veces no resultan.

A mis amigos de vida, Pipe, Pingüino, Johany, Pablo, Claudia, Sebastián, Javi, Eli, y a la más antigua, Maite, por siempre estar conmigo, por el apoyo constante y porque ni las distancias intercontinentales cambian las verdaderas amistades.

A mi familia, repartida de Antofagasta a Punta Arenas, porque siempre nos cuidamos y nos queremos a pesar de que ya no nos vemos todos los días. Y a los que ya no están, por ser mis referentes en muchos aspectos de la vida.

A mis tres pilares fundamentales. A mi papá por siempre creer en mí y aceptarme como soy. A mi mamá por ser mi mejor amiga, mi mayor confidente y la mejor mamá del mundo. Y a Cristian, por apoyarme en todas mis decisiones (incluso en las malas), por tu infinita paciencia y comprensión, y por crecer conmigo estos doce años.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Dr. Sergio A. Álvarez y Dr. Carlos A. Santiviago. Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1130225 del Dr. Álvarez, los proyectos FONDECYT 1140754 y 1171844 del Dr. Santiviago y la beca CONICYT de Doctorado Nacional 21140692.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- Fernández PA, Velásquez F, Garcias-Papayani H, Amaya FA, Ortega J, Gómez S, Santiviago CA, Álvarez SA (2018). **Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability.** *Front Microbiol* 9:1220.
- Silva-Valenzuela CA, Velásquez F, Peñailillo J, Garcias-Papayani H, Fernández P, Tobar P, Contreras I, Santiviago CA, Álvarez SA (2016). **O-antigen chain-length distribution in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is regulated by oxygen availability.** *Biochem Biophys Res Commun* 477(4):563-567.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- **Fnr regulates lipid A modification in *Salmonella* Enteritidis by controlling the expression of genes involved in this process in response to oxygen availability.** Fernández P, Velásquez F, Garcias-Papayani H, Silva CA, Amaya F, Espinoza C, Ortega J, Santiviago CA, Álvarez SA. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Santiago, Chile. Noviembre 2018.
- **Changes in lipid a hydroxylation and *lpxO* expression are regulated by the global regulator Fnr in *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Velásquez F, Ortega J, Silva CA, Garcias H, Amaya F, Santiviago CA, Álvarez SA. 7th Congress of European Microbiologists. Valencia, España. Julio 2017.
- **El factor transcripcional ArcA participa en la regulación oxígeno-dependiente de las modificaciones covalentes del lípido A en *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Velásquez F, Silva CA, Garcias H, Amaya F, Santiviago CA, Álvarez SA. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Rosario, Argentina. Septiembre 2016.
- **Changes in expression of genes involved in O-Antigen chain-length regulation and lipid A covalent modification are regulated by Fnr in *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Amaya F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez SA. ASM Microbe & ICAAC Congress. Boston, MA, USA. Junio 2016.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- **Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability.** Fernández P, Velásquez F, Ortega J, Garcias H, Amaya F, Silva CA, Santiviago CA, Álvarez SA. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. Noviembre 2017.
- **La expresión de los determinantes de largo de cadena del antígeno O es regulada por Fnr y ArcA en *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Amaya F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez SA. XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. Noviembre 2016.
- **Participación de Fnr en la regulación de la expresión de genes involucrados en la modificación covalente del lípido A-core en *Salmonella* Enteritidis.** Fernández P, Silva CA, Velásquez F, Garcias H, Santiviago CA, Álvarez AA. XXXVII Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile. Diciembre 2015.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i>	2
I.1.1. Adaptación ambiental de <i>Salmonella</i> y su efecto sobre la virulencia	3
I.1.2. Respuesta a variaciones en la disponibilidad de oxígeno y su impacto sobre la virulencia de <i>Salmonella</i>	5
I.1.3. Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> en otros modelos biológicos de infección	7
I.2. Estructura y biosíntesis del lipopolisacárido de <i>Salmonella</i>	9
I.2.1. Modificación del LPS y su impacto sobre la virulencia de <i>Salmonella</i> ..	11
I.2.2. Reconocimiento del lipopolisacárido de <i>Salmonella</i> en <i>Danio rerio</i>	14
I.2.3. Regulación ambiental de la estructura del lípido A de <i>Salmonella</i>	15
I.2.4. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la estructura del lipopolisacárido	16
I.3. HIPÓTESIS	20
I.4. OBJETIVO GENERAL	20
I.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
II. MATERIALES Y MÉTODOS	21
II.1. Reactivos	21
II.2. Cepas bacterianas	23
II.3. Plasmidios	24
II.4. Partidores	25
II.5. Medios y condiciones de cultivo bacterianos	27
II.6. Identificación serológica de las cepas de <i>S. Enteritidis</i> mediante ensayos de aglutinación	28
II.7. Purificación y análisis de ácidos nucleicos	28
II.8. Transformación por electroporación con plasmidios o productos de PCR	29
II.9. Obtención de mutantes de <i>S. Enteritidis</i> NCTC13349	30
II.9.1. Obtención de productos de PCR	30
II.9.2. Mutagénesis por remplazo alélico	31

II.9.3. Movilización de los alelos mutantes por transducción	32
II.9.4. Eliminación del <i>cassette</i> de resistencia	33
II.10. Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras	34
II.11. Reinserción de alelos en el cromosoma de <i>S. Enteritidis</i> con plasmidios derivados de pWRK-Cam	34
II.11.1. Inserción de mutaciones puntuales por <i>overlap extension</i> PCR	35
II.11.2. Clonamiento en el vector pGEM-T Easy	37
II.11.3. Subclonamiento en vector pWRK-Cam	39
II.11.4. Transformación e inserción de los plasmidios pWRK en el genoma de <i>S. Enteritidis</i>	40
II.11.5. Confirmación de la introducción de las mutaciones puntuales en el promotor de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i>	41
II.12. Construcciones de fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i>	41
II.13. Ensayos enzimáticos de β-galactosidasa en cultivos de <i>S. Enteritidis</i>	43
II.14. Análisis de la unión de ArcA y FnrD154A a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i>	43
II.14.1. Amplificación de las regiones promotoras	44
II.14.2. Obtención de las proteínas recombinantes ArcA y FnrD154A	44
II.14.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	47
II.14.4. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	47
II.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida de LPS	48
II.16. Ensayos de infección de <i>Danio rerio</i> con cepas de <i>S. Enteritidis</i> mediante inmersión estática	49
II.16.1. Mantenimiento de las larvas de pez cebra	50
II.16.2. Infección de larvas de pez cebra mediante inmersión estática	50
II.17. Análisis estadístico	51
III. RESULTADOS	52
III.1. La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS presentan sitios de unión funcionales a ArcA y Fnr	52
III.1.1. Análisis bioinformáticos revelan que existen sitios hipotéticos de unión a ArcA y Fnr en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i>	52
III.1.2. ArcA fosforilado y FnrD154A se unen a las regiones promotoras de genes involucrados en la síntesis y modificación del LPS <i>in vitro</i>	54
III.2. Construcción de mutantes regulatorias en <i>S. Enteritidis</i>	62
III.2.1. Selección de los genes involucrados en la dinámica estructural del LPS sobre los cuales se construyeron las mutantes regulatorias de <i>S. Enteritidis</i>	62
III.2.2. La regulación oxígeno dependiente de la expresión de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> es modulada por ArcA en <i>S. Enteritidis</i>	63

III.2.3. Selección de las mutaciones puntuales a generar en los promotores de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en <i>S. Enteritidis</i>	64
III.3. La mutación puntual de los ABS presentes en la región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> disminuye la afinidad de los promotores por ArcA-P66	
III.4. Ensayos de infección de larvas de pez cebra con cepas de <i>S. Enteritidis</i>	71
III.4.1. La inactivación del gen <i>lpxO</i> en <i>S. Enteritidis</i> genera un fenotipo hipervirulento durante la infección en <i>Danio rerio</i>	72
III.4.2. La inactivación del gen <i>pagP</i> en <i>S. Enteritidis</i> genera un fenotipo atenuado durante la infección de larvas de <i>Danio rerio</i>	76
III.4.3. La mutante regulatoria atenuada <i>S. Enteritidis</i> $\Delta pagP/pWRK-P_{xx}-pagP$ carece de lípido A heptaacilado debido a la inactivación del promotor del gen <i>pagP</i>	80
IV. DISCUSIÓN	84
V. CONCLUSIONES	93
VI. REFERENCIAS	94
ANEXO 1. ArcA y FnrD154A se unen a las regiones promotoras de genes de <i>S. Enteritidis</i> involucrados en la síntesis y modificación del LPS	104
ANEXO 2. Construcción de mutantes regulatorias en los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i>	107
A2.1. Construcción de vectores pWRK que contienen alelos intactos o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i>	108
A2.1.1. Generación de mutaciones puntuales en los promotores de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> mediante <i>overlap extension</i> PCR	108
A2.1.2. Clonamiento de los alelos intactos o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en pGEM-T Easy	110
A2.1.3. Subclonamiento de los alelos silvestres o mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en pWRK Cam	111
A2.2. Reinserción en <i>cis</i> de los alelos silvestres y mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de <i>S. Enteritidis</i>	112
A2.2.1. Generación de mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de <i>S. Enteritidis</i> por reemplazo alélico	112
A2.2.2. Inserción cromosomal de los plasmidios pWRK en las mutantes $\Delta lpxO$ y $\Delta pagP$ de <i>S. Enteritidis</i>	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	23
Tabla 2. Plasmidios utilizados en esta tesis	24
Tabla 3. Partidores utilizados en esta tesis	25
Tabla 4. Índice del estado fisiológico de larvas de <i>Danio rerio</i> durante la infección con cepas de <i>S. Enteritidis</i>	51
Tabla 5. ABS y FBS hipotéticos identificados en la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS	54
Tabla 6. Supervivencia de larvas de <i>Danio rerio</i> infectadas con cepas de <i>S. Enteritidis</i> ...	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del lipopolisacárido (LPS) de <i>S. Enteritidis</i>	10
Figura 2. Modificación covalente del lípido A de <i>Salmonella</i>	13
Figura 3. La disponibilidad de oxígeno modula la hidroxilación del lípido A y la expresión de <i>lpxO</i> en <i>S. Enteritidis</i>	18
Figura 4. Esquema general de la estrategia de inserción de alelos en el cromosoma de <i>S. Enteritidis</i> con plasmidios derivados de pWRK-Cam	36
Figura 5. Esquema de introducción de mutaciones puntuales mediante <i>overlap extension</i> PCR	38
Figura 6. La región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> contienen ABS y FBS hipotéticos	53
Figura 7. ArcA-P se une a la región promotora del gen <i>lpxO</i> <i>in vitro</i>	56
Figura 8. ArcA-P se une a la región promotora del gen <i>pagP</i> <i>in vitro</i>	57
Figura 9. FnrD154A se une a la región promotora de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> <i>in vitro</i>	58
Figura 10. ArcA-P se une a la región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i>	60
Figura 11. FnrD154A se une a la región promotora de genes de <i>S. Enteritidis</i> involucrados en la dinámica estructural del LPS	61
Figura 12. ArcA participa en la regulación de la expresión de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> dependiente de oxígeno en <i>S. Enteritidis</i>	65
Figura 13. Las mutaciones puntuales en L-ABS1 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen <i>lpxO</i> y ArcA-P <i>in vitro</i>	68
Figura 14. Las mutaciones puntuales en P-ABS2 y P-ABS3 disminuyen la afinidad entre el promotor del gen <i>pagP</i> y ArcA-P <i>in vitro</i>	70
Figura 15. Ensayo preliminar de infección de larvas de pez cebra con cepas de <i>S. Enteritidis</i>	73
Figura 16. La cepa <i>S. Enteritidis</i> Δ <i>lpxO</i> /pWRK-P _x - <i>lpxO</i> carece de antígeno O	76
Figura 17. La mutante Δ <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i> y la mutante regulatoria para el mismo gen presentan un fenotipo atenuado en ensayos de infección de larvas de pez cebra ...	79
Figura 18. La cepa <i>S. Enteritidis</i> Δ <i>pagP</i> /pWRK-P _{xx} - <i>pagP</i> no expresa <i>pagP</i>	83
Figura 19. La región promotora de genes involucrados en la dinámica estructural del LPS en <i>S. Enteritidis</i> contienen ABS y FBS hipotéticos	105
Figura 20. Generación de mutaciones puntuales en L-ABS1 en el promotor del gen <i>lpxO</i>	109
Figura 21. Generación de mutaciones puntuales en P-ABS2 y P-ABS3 en el promotor del gen <i>pagP</i>	110
Figura 22. Construcción de vectores derivados de pWRK-Cam que contienen alelos silvestres o mutados de los genes <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i>	112
Figura 23. Reinserción en <i>cis</i> de alelos silvestres y mutados de <i>lpxO</i> y <i>pagP</i> en mutantes Δ <i>lpxO</i> y Δ <i>pagP</i> de <i>S. Enteritidis</i>	114

ABREVIATURAS

A/BA:	Acrilamida/Bisacrilamida
ABS:	Sitio de unión a ArcA
AgO:	Antígeno O
Amp:	Ampicilina
ArcA-P:	ArcA fosforilado
bp:	Pares de bases
Cam:	Cloranfenicol
CAMP:	Péptido catiónico antimicrobiano
DO₆₀₀:	Densidad óptica medida a 600 nm
dNTP:	Desoxinucleotido trifosfato
dpf:	Días post fertilización
dpi:	Días post infección
DTT	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA:	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
FBS:	Sitio de unión a Fnr
g:	Aceleración de gravedad
hpi:	Horas post infección
IPEF	Índice promedio del estado fisiológico
kV:	Kilo Volts
LB:	Medio Luria Bertani
LPS:	Lipopolisacárido
MME:	Medio mínimo E
ONPG:	2-nitrofenil β -D-galactopiranosido
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA:	Persulfato de amonio
SAP:	Fosfatasa alcalina de camarón
SCV:	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SPI:	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
TAE:	Amortiguador Tris-ácido acético-EDTA
TBE:	Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED:	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina