

Tesis Doctoral

# Mutantes de Salmonella enterica en el gen de ADN adenina metil transferasa (dam). ¿Cepas ideales para la construcción de vacunas?

Sarnacki, Sebastián Hernán

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sarnacki, Sebastián Hernán. (2010). Mutantes de Salmonella enterica en el gen de ADN adenina metil transferasa (dam). ¿Cepas ideales para la construcción de vacunas?. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sarnacki, Sebastián Hernán. "Mutantes de Salmonella enterica en el gen de ADN adenina metil transferasa (dam). ¿Cepas ideales para la construcción de vacunas?". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**MUTANTES DE *Salmonella enterica* EN EL GEN DE ADN ADENINA METIL  
TRANSFERASA (*dam*).**

**¿CEPAS IDEALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE VACUNAS?**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Química Biológica

Sebastián Hernán Sarnacki

Directora de Tesis: Dra. M. Cristina Cerquetti

Consejera de Estudios: Dra. Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-UBA-  
CONICET, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de  
Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010

## Resumen

### MUTANTES DE *Salmonella enterica* EN EL GEN DE ADN ADENINA METIL TRANSFERASA.

#### ¿CEPAS IDEALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE VACUNAS?

La enzima ADN adenina metiltransferasa (Dam) es un regulador global de la expresión de genes en bacterias. En estudios previos, las mutantes *dam* de *Salmonella* Typhimurium han sido postuladas como excelentes cepas vacunales por su atenuación y su capacidad protectora. Por extensión, la mutación en el gen *dam* se ha propuesto como método de atenuación para una gran variedad de especies bacterianas.

Dado nuestro interés en el estudio y prevención de las infecciones por *Salmonella* Enteritidis (serovariedad que con mayor frecuencia causa enterocolitis en humanos) generamos mutantes *dam* de dicha serovariedad, mediante mutagénesis por transposición y por mutagénesis dirigida por reemplazo.

Curiosamente, los estudios en ratones Balb/c mostraron que las mutantes *dam* de *S.* Enteritidis, son sólo moderadas en su atenuación, ya que un 30 % de los animales inoculados por la vía intragástrica con la mutante muere dentro de las 3 semanas. Por otro lado, la protección de los animales inmunizados, contra el desafío con la cepa virulenta de *Salmonella* Enteritidis #5694, no alcanzó niveles aceptables.

Dado el papel crítico que los macrófagos desempeñan en la inmunidad innata contra *Salmonella*, analizamos la interacción entre la mutante SE $\Delta$ *dam* y la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Mediante ensayos de *Western blot* pudo determinarse que la expresión de moléculas proinflamatorias en los macrófagos infectados con SE $\Delta$ *dam* está atenuada.

Como en parte, la activación de la respuesta inflamatoria del macrófago se genera a través de antígenos bacterianos, nos preguntamos si la carencia de Dam podría estar afectando la estructura o función de ciertas proteínas efectoras o del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella* Enteritidis.

Estudiamos entonces la participación de la proteína Dam sobre la síntesis y secreción de dos proteínas efectoras dependientes del Sistema de Secreción Tipo Tres (SSTT-1). A este fin debieron construirse y caracterizarse mutantes *dam* de *Salmonella* portadoras de genes *sopA* y *sopB* marcados con el epítoto FLAG. Los resultados obtenidos mostraron que la mutante *dam* posee una reducida expresión y secreción de las proteínas de invasión SopA y SopB, dependientes de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1). Este hallazgo indica que la metilación por Dam participa en la regulación de la síntesis y secreción de SopA y SopB en *Salmonella* como un activador de estos genes.

Investigamos también la participación de la enzima Dam en la síntesis del LPS de *S. Enteritidis*. Encontramos que la mutante SE $\Delta$ *dam* sintetiza LPS con un antígeno polisacárido O de cadenas más cortas que el de la cepa parental. Dado que Wzz es responsable en la distribución del largo de cadena del antígeno O, analizamos si la metilación por Dam está involucrada en la regulación de la expresión del gen *wzz*. El análisis densitométrico de *Western Blot* con muestras de extractos proteicos mostró que la cantidad relativa de proteína Wzz producida por SE $\Delta$ *dam*, es tres veces menor que la producida por la cepa parental. Concomitantemente, la actividad del promotor de *wzz* en SE $\Delta$ *dam* medida con fusión transcripcional cromosómica con un gen reportero y la cantidad de ARNm medido por RT-PCR cuantitativa a tiempo real se vieron reducidas. También se redujo la expresión de los genes *pmrA* y *rcsB* (dos reguladores de *wzz*) en la mutante *dam*. Sin embargo, el defecto de SE $\Delta$ *dam* en la distribución del largo de cadena del antígeno O, sólo se asoció con RcsB. Nuestros resultados demuestran que la metilación por Dam regula la síntesis del LPS en *Salmonella*.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la metilación por Dam en *Salmonella* regula funciones relacionadas íntimamente con la interacción huésped-bacteria. Por lo tanto, la delección del gen *dam* como método de atenuación en cepas vacunales debe ser analizada críticamente.

**Palabras claves:** *Salmonella enterica*, mutantes *dam*, respuesta inflamatoria, sistema de secreción tipo tres, lipopolisacárido.

## Summary

### *Salmonella enterica* DNA ADENINE METHYLTRANSFERASE MUTANT:

#### IDEAL STRAINS FOR VACCINE DEVELOPMENT?

DNA adenine methyltransferase (Dam) enzyme is a global regulator of bacterial gene expression. In previous studies, *Salmonella* Typhimurium *dam* mutants have been proposed as excellent vaccine strains because of their characteristic of attenuation and protective capabilities. By extension, *dam* gene mutation has been proposed as a method for attenuating a variety of bacterial species.

Given our interest in the study and prevention of infections with *Salmonella* Enteritidis, a serotype that most commonly causes enterocolitis in humans, we generate *S. Enteritidis dam* mutants by transposition and site-directed mutagenesis by replacement.

Interestingly, studies in Balb/c mice showed that the *S. Enteritidis dam* mutants, are only moderate in their attenuation. Thirty percent (30%) of animals inoculated by the intragastric route with the mutant died within 3 weeks. Moreover, the protection of immunized animals challenge with the virulent strain of *Salmonella* Enteritidis # 5694, did not reach acceptable levels.

Given the critical role that macrophages play in innate immunity against *Salmonella*, we analyzed the interaction between *SEΔdam* mutant and macrophage cell line RAW 264.7. By Western blot, we found that the expression of inflammatory molecules in macrophages infected with *SEΔdam* is attenuated.

As activation of the inflammatory response of macrophages is generated in part by bacterial antigens, we wondered whether the lack of Dam might be affecting the structure or function of certain effector proteins or lipopolysaccharide (LPS) of *Salmonella* Enteritidis. Therefore, we studied the involvement of Dam on protein synthesis and secretion of two effector proteins both dependent on type 3 secretion systems. To this purpose, we constructed and characterized *Salmonella dam* mutants carrying *sopA* and *sopB* genes tagged with the FLAG epitope. The results showed that the *dam* mutant has a reduced expression and secretion of SopA and SopB invasion

proteins, which are *Salmonella* pathogenicity island (SPI-1)-dependent. This finding indicates that Dam methylation is involved in the regulation of the synthesis and secretion of SopA and SopB proteins in *Salmonella* as an upregulator of these genes.

We also investigated the involvement of the Dam enzyme in *S. Enteritidis* LPS synthesis. We found that compared to the parental strain, a  $SE\Delta dam$  mutant synthesized LPS with shorter O-antigen polysaccharide chain lengths. Since Wzz is responsible for the chain length distribution of O-antigen, we investigated whether Dam methylation is involved in regulating *wzz* gene expression. Densitometric analysis of Western blot with samples of protein extracts showed that the relative amount of Wzz protein produced by  $SE\Delta dam$  is three-fold lower than that of the parental strain. Concomitantly, *wzz* gene promoter activity in  $SE\Delta dam$  was reduced, as measured by chromosomal transcriptional fusion with a reporter gene, and this result was further confirmed by the amount of mRNA as measured by RT-PCR quantitative real-time analysis. Also, the expression of *pmrA* and *rscB* genes (two *wzz* gene regulators) in the *dam* mutant was reduced. However, the defect in the chain length distribution of O-antigen of the  $SE\Delta dam$ , was associated only with RcsB. Our results show that Dam methylation regulates the LPS synthesis of *Salmonella*.

Overall, these results indicate that Dam methylation in *Salmonella* regulates functions related intimately to the host-bacteria interaction. Therefore, the *dam* gene deletion as a method of attenuation of vaccine strains must be analyzed critically.

**Keywords:** *Salmonella enterica*, *dam* mutant, inflammatory response, type three secretion system, lipopolysaccharide

*Dedicado a mis padres Juany y Euge, a mis hermanos Vane y Ary,  
a mis sobrinos Cami y Fran, y a Cris, madre microbiológica,  
por su apoyo, estímulo y amor*

*Deseo expresar mi reconocimiento:*

*Al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFyBO-CONICET y al Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina UBA por haberme dado el espacio para realizar esta Tesis Doctoral.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la American Society for Microbiology (ASM), la International Union of Microbiological Societies (IUMS), AMSUD-PASTEUR y UNESCO-ASM por el otorgamiento de becas, las que me permitieron realizar los estudios de esta Tesis Doctoral.*

*Deseo expresar mi agradecimiento:*

*De manera muy especial a mi directora de tesis, Dra. M. Cristina Cerquetti, por haberme brindado su capacidad, experiencia y enseñanzas, en un marco de gran generosidad, confianza, paciencia, afecto y amistad. Por haberme dado la oportunidad de iniciar mi formación en el campo de la investigación y fundamentalmente, por poder contar con su cariño; a mi madre microbiológica, GRACIAS!*

*Al Dr. Miguel A. Valvano, Director del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Western Ontario (UWO), por haberme permitido realizar gran parte de los estudios en su laboratorio, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo y por su gran generosidad.*

*Agradezco a la Dra. Ana M. Franchi, Directora del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFyBO-CONICET y al Dr. Daniel O. Sordelli, director del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina-UBA por haberme permitido realizar este en sus respectivos lugares de trabajo.*

*A Cristina L. Marolda, no sólo por su permanente disposición y desinteresada ayuda, si no también por que me brindó todo su cariño cuando me sentí sólo y por hacer que Argentina estuviese cerquita proveyéndome de Titas.*

*A la Dra. Nora B. Goren y su becaria y compañera Eugenia Hovsepián, por sus consejos, gran ayuda y colaboración en la realización de experimentos para esta Tesis.*

*A todo el personal del Departamento y del CEFyBO tanto de secretaría, ACADeMIC, administración, biblioteca, mantenimiento y limpieza, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno les competen han colaborado y brindado siempre una sonrisa.*

*A mis compañeras y amigas del labo, hermanas microbiológicas Mony y Angy, por su apoyo, ánimo, cariño, calidez y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos. Por compartir también conmigo, muchos momentos de nuestras vidas, alegres y tristes. Por contar siempre con su mano amiga, por escucharme y por sobre todo, por brindarme su amistad desde el día en que nos conocimos.*



*A Maribel, no sólo por su excelente y gran apoyo técnico, sino por su paciencia aguantando mis rayes, por su preocupación por mi bienestar y por su continuo y afectuoso aliento y cariño.*

*A Charito (Ms. Colombia) y Ale, las nuevas “adquisiciones” del laboratorio quienes transmiten una gran energía y tienen gran entusiasmo por esas cosas pequeñas del labo; siempre dispuestas a ayudar y participar en todo.*

*A mis compañeros del labo canadiense, Piya, Karen, Fiona, Daniel, Sole, Kinna, Jason, Ron, Julie, Kendra, Mike, Xime, Slade, Laura, Megan, Jennifer y Emilie, quienes hicieron de mi estadía una de las mayores y mejores experiencias en mi vida. Por hacerme sentir parte del laboratorio desde el primer día, ayudarme en todo momento, por sus esfuerzos para interpretarme, por el gran intercambio cultural y por haberme sacado a pasear por todo Canadá.*

*A las cabezas de laboratorios vecinos y al resto de los compañeros del Departamento de Microbiología, parasitología e inmunología Euge, Fede, Lu, Santi, Sol, Marian, Lore M., Lore T., Ceci, Paula, Mario, Rita, Sil, Agus, Jorge, Viki, Ale, Taña, Coti y Ailin, con los que comparto las mismas experiencias y nos ponemos el hombro cada vez que se necesita, por su apoyo y ánimo en cada etapa a lo largo de estos años de estudio y por hacer del Becalarío... lo que es!*

*A mis padres, Juany y Euge, y mis hermanos, Vane y Ary, por brindarme absolutamente todo y enseñarme que la perseverancia, el esfuerzo y por sobre todo la unión, son el camino para lograr los objetivos. Por apoyarme en todo momento y lugar. Por darme las fuerzas y el valor para seguir adelante y alcanzar este objetivo. Por su gran ayuda, comprensión y amor.*

*A mis sobrinos que tanto amo, Cami y Fran, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.*

*A mis cuñás, Tati y Juan, por estar ahí presentes y firmes siempre, quienes sin que lo sepan, admiro tanto.*

*A toda, absolutamente toda mi familia, abuelos y abuelas, tíos y tías, primos y primas primeros, segundos y terceros, que también me han acompañado y forman parte de todo este gran proyecto el cual no hubiera sido posible sin su presencia.*

*A mis AMIGOS, compañeros de la vida por elección, por el aguante que me tienen a todo trapo, por la garra que me dan para continuar, por escucharme, por entenderme, por que si bien muchos estan lejos, siempre todos estan a mi lado y por tantas otras cosas más que siento, y que se me hacen difíciles de volcar en estas líneas por que siento que nunca va alcanzar.*

*En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, y que saben que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo su apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo amistad y amor.*

*A todos, simplemente GRACIAS!*

**El contenido de esta Tesis ha sido parcialmente publicado en:**

**Sarnacki S. H**, C. L. Marolda, M. Noto Llana, M. N. Giacomodonato, M. A. Valvano y M. C. Cerquetti. 2009. Dam methylation controls O-antigen chain length in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by regulating the expression of Wzz protein. *J. Bacteriol.* 191(21):6694-6700.

Giacomodonato M. N., **S. H. Sarnacki**, M. Noto Lana, y M. C. Cerquetti. Dam and its role in pathogenicity of *Salmonella enterica*. 2009. Review. *Journals of Infection in Developing Countries.* 3(7):484-490.

Giacomodonato M. N., **S. H. Sarnacki**, M. Noto Lana, S. Uzzau, S. Rubino y M. C. Cerquetti. 2009. Impaired synthesis and secretion of SopA in *Salmonella* Typhimurium *dam* mutants. *FEMS Microbiology Letters.* 292(1):71-77.

Cerquetti M. C., E. Hovsepian, **S. H. Sarnacki** y N. B. Goren. 2008. *Salmonella dam* mutant induces low NOS-2 and COX-2 expression via MAPK and NF-kB pathways attenuation in macrophages. *Microbes Infect.* 10(14-15):1431-1439.

Giacomodonato M. N., **S. H. Sarnacki**, R. L. Caccuri, D. O. Sordelli, y M. C. Cerquetti. 2004. Host response to a *dam* mutant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a temperature-sensitive phenotype. *Infect. Immun.* 72(9):5498-5501.

## PRÓLOGO

*Me incorporé al grupo de investigación de la Dra. Cerquetti en Agosto de 2001. El grupo trabajaba en distintas líneas de investigación, todas relacionadas con cepas de Salmonella atenuadas por termosensibilidad. Una de esas líneas había logrado obtener una cepa mutante termosensible por transposición, lo que incrementaba las chances de construir cepas de Salmonella atenuadas con bajo índice de reversión. La mutante termosensible obtenida era una cepa de S. Typhimurium con una inserción de un mini transposón en el gen de la ADN adenina metiltransferasa (dam) (La proteína Dam es la encargada de metilar el ADN recién sintetizado). Esta inserción generó dos efectos en la mutante: i) la termosensibilidad para el crecimiento de la bacteria (buen crecimiento a 28 °C y desarrollo afectado a 37 °C) probablemente causada por el segundo efecto ii) la síntesis de una proteína Dam truncada en los últimos 10 aminoácidos (¿una proteína Dam termosensible?).*

*Uno de mis primeros experimentos en el laboratorio fue la transducción de esa inserción desde el genoma de S. Typhimurium al genoma de S. Enteritidis. Y así comienza esta Tesis.*

# Índice

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>0</b>
<b>Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
El género <i>Salmonella</i> .....	4
Fisiopatología .....	4
Prevención de las infecciones por <i>Salmonella</i> : Vacunas .....	7
Mutantes <i>dam</i> de <i>Salmonella</i> .....	8
Metilación del ADN y la proteína ADN Adenina Metiltransferasa (Dam) .....	9
Efecto regulatorio de la metilación por Dam .....	10
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>Desarrollo Experimental</b> .....	<b>15</b>
1. Obtención de la mutante SD1 de <i>S. Enteritidis</i> con fenotipo Dam termosensible .....	16
2. Caracterización de la mutante SD1 de <i>S. Enteritidis</i> .....	16
2. 1. Crecimiento en medio sólido .....	16
2. 2. Crecimiento en medio líquido .....	18
2.2.1. Curva de DO vs. Tiempo .....	18
2. 2. 2. Curvas de viabilidad .....	18
2. 2. 3. Curva de densidad bacteriana vs. DO .....	19
2. 3. Morfología .....	20
2. 4. Estado de metilación del ADN de la cepa SD1 .....	22
3. Determinación de la atenuación de la mutante SD1 .....	23
4. Interacción temprana de la mutante SD1 con la mucosa intestinal .....	24
5. Colonización y persistencia .....	26
6. Capacidad protectora de la mutante SD1 .....	27
6.1. Determinación de la depuración esplénica .....	27
6.2. Determinación de la sobrevivencia al desafío con la cepa virulenta .....	28
<b>Discusión</b> .....	<b>30</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>36</b>
1. Bacterias y cultivos bacterianos .....	37
2. Animales .....	38
3. Técnica de transducción .....	38
3.1. Condiciones de crecimiento del bacteriófago en la cepa bacteriana donante .....	38
3.2. Ensayo de placa para la titulación de los lisados transductores .....	38
3.3. Ensayo de transducción .....	39
3.4. Selección de la cepa termosensible <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> #5694, SD1 .....	39
4. Extracción plasmídica .....	40
5. Técnicas de transformación por electroporación .....	40
5.1. Obtención de células electrocompetentes .....	40
5.2. Ensayo de electroporación .....	40
6. Conservación de cepas .....	41
7. Estudio de crecimiento de la mutante SD1 en medio sólido una vez aislada .....	41
8. Microscopía .....	41

9. Curvas de crecimiento bacteriano	41
10. Estado de metilación del ADN de la mutante <i>dam</i>	42
11. Determinación de la dosis letal 50	42
12. Estudio de colonización y persistencia	43
13. Estudio de interacción temprana de la mutante SD1 con la mucosa intestinal	43
14. Estudios de depuración esplénica	44
15. Estudios de protección (sobrevida luego del desafío)	45
16. Estadística	45
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>52</b>
<b>Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 2</b>	<b>53</b>
<b>Introducción</b>	<b>54</b>
<i>Salmonella</i> : un patógeno huésped-específico	55
Citotoxicidad mediada por <i>Salmonella</i> spp.	55
Oxido nítrico y apoptosis	56
NF-κB y MAPK como integradores de la respuesta inflamatoria	56
Vía de NF-κB	56
Vía de las MAPK	57
Participación de la proteína Dam en la virulencia de <i>Salmonella</i> spp.	57
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>58</b>
<b>Desarrollo Experimental</b>	<b>60</b>
1. Obtención de una mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> (SEΔ <i>dam</i> ) por delección	61
1. 1. Comprobación del fenotipo <i>dam</i> de la cepa SEΔ <i>dam</i>	61
1. 2. Estado de metilación del ADN de la mutante SEΔ <i>dam</i>	61
2. Estudio de la atenuación y de la capacidad protectora de la mutante SEΔ <i>dam</i>	62
3. Interacción de la cepa SEΔ <i>dam</i> con macrófagos en cultivo	65
<b>Discusión</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>73</b>
1. Generación de la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	74
2. Caracterización fenotípica de la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	74
3. Estudio de la virulencia y capacidad protectora de la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	74
4. Estudio de la interacción de la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> con macrófagos en cultivo	75
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>76</b>

<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>80</b>
<b>Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 3</b> .....	<b>81</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>82</b>
Sistemas de secreción .....	83
Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp. ....	83
SopA .....	85
SopB .....	86
Regulación de la expresión génica de la SPI-1 y la SPI-2 .....	88
Influencia de la metilación por Dam en la secreción de proteínas pertenecientes al SSTT .....	89
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>91</b>
<b>Desarrollo Experimental</b> .....	<b>93</b>
1. Obtención de las mutantes <i>dam</i> de <i>S. Typhimurium</i> con los genes <i>sopA</i> y <i>sopB</i> marcados con el epítotope FLAG .....	94
2. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes <i>dam</i> marcadas .....	94
2.1. Crecimiento en medio sólido .....	94
2.2. Crecimiento en medio líquido .....	95
2.3. Estado de metilación del ADN de la mutantes <i>dam</i> .....	95
2.4. Morfología bacteriana .....	95
2.5. Control de la inocuidad de la marcación con FLAG en las diferentes cepas generadas .....	97
3. Expresión de SopA y SopB, in vitro, en cepas de <i>S. Typhimurium</i> carentes de Dam .....	98
4. Secreción de SopA y SopB, in vitro, por cepas de <i>S. Typhimurium</i> carentes de Dam .....	101
5. Expresión de <i>sopA</i> y <i>sopB</i> en mutantes <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> .....	103
<b>Discusión</b> .....	<b>105</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>109</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>111</b>
1. Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas .....	112
2. Generación de cepas bacterianas con efectores marcados .....	112
3. Técnica de transducción .....	114
4. Extracción plasmídica .....	114
5. Técnicas de transformación por electroporación .....	114
5. 1. Obtención de células electrocompetentes .....	114
5. 2. Ensayo de electroporación .....	115
5. 3. Selección de la cepa complementada de <i>S. Typhimurium</i> , STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833 .....	115
6. Conservación de cepas .....	115
7. Caracterización fenotípica de cepas mutantes de <i>S. Typhimurium</i> .....	116
7. 1. Curvas de crecimiento bacteriano .....	116
7. 2. Morfología bacteriana .....	116
7. 2. 1. Microscopía .....	116
7. 2. 2. Crecimiento en placa .....	116
7. 3. Estado de metilación del ADN de la mutantes <i>dam</i> .....	116
8. Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	117
9. Conservación de línea celular .....	117
10. Invasión y proliferación de las mutantes <i>dam</i> en células HEp-2 .....	117
10. 1. Condiciones de cultivos para infección celular .....	117
10. 2. Infección de células HEp-2: Ensayo de protección a gentamicina .....	117

11. Análisis de la participación de la proteína Dam en la expresión y secreción de los efectores SopA y SopB in vitro	118
11.1. Cultivos bacterianos	118
11.2. Análisis de la expresión de proteínas	119
11.3. Análisis de la secreción de proteínas	119
12. Detección y análisis de las proteínas marcadas con FLAG	119
12.1. <i>Western blot</i>	119
12. 2. Cuantificación de los <i>Western blots</i>	120
13. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	120
14. Estadística	120
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>121</b>
<b>CAPITULO 4</b>	<b>126</b>
<b>Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 4</b>	<b>127</b>
<b>Introducción</b>	<b>129</b>
El Lipopolisacárido y su estructura	130
Funciones del LPS	132
Biosíntesis del LPS	134
Regulación de la síntesis del LPS	137
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>139</b>
<b>Desarrollo Experimental</b>	<b>141</b>
1. Análisis del patrón del LPS en la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	142
2. Estudio de la participación de la proteína Dam en la regulación de la síntesis de Wzz	143
2.1. Expresión de la proteína Wzz en la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	144
2.2. Actividad del promotor del gen <i>wzz</i> en la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	145
2.3. Transcripción del gen <i>wzz</i> en la mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i>	147
2.4. Producción de LPS en la cepa mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> transformada con el gen <i>wzz</i>	148
3. Análisis de la expresión de los reguladores del gen <i>wzz</i> en la cepa mutante $SE\Delta dam$	149
3.1. Estudio de la transcripción de los reguladores de la expresión del gen <i>wzz</i>	150
3.2. Producción de LPS en la cepa mutante <i>dam</i> de <i>S. Enteritidis</i> transformada con el gen <i>pmrA</i> o <i>rcsB</i>	150
3.3. Estudio del patrón del LPS en ausencia del gen <i>rcsB</i>	152
<b>Discusión</b>	<b>154</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>159</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>161</b>
1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	162
2. Técnicas de transformación	165
2.1. Transformación con $CaCl_2$	165
2.1.1. Obtención de células competentes	165
2.1.2. Ensayo de transformación	165
2.2. Transformación por electroporación	166
2.2.1. Obtención de células electrocompetentes	166
2.2.2. Ensayo de electroporación	166
3. Construcción de la fusión transcripcional <i>lacZ</i> al promotor del gen <i>wzz</i> en el plásmido pFZY1	166

4. Construcción de la fusión transcripcional cromosómica <i>lacZY</i> al promotor del gen <i>wzz</i> .....	167
5. Clonado molecular de los genes <i>pmrA</i> y <i>resB</i> de <i>S. Enteritidis</i> .....	167
6. Clonado molecular del gen <i>wzz</i> de <i>S. Enteritidis</i> .....	168
7. Perfil y análisis de LPS .....	168
8. Estudio de $\beta$ -Galactosidasa .....	168
9. Análisis de proteínas.....	169
10. Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR) .....	169
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>171</b>
<b>Futuro .....</b>	<b>177</b>
<b>Conclusión General.....</b>	<b>179</b>



## **CAPÍTULO 1**

**¿Una cepa de *Salmonella enterica* que sintetiza una proteína Dam termosensible?**

# Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 1

## Hechos

- ✓ Existen más de 2.000 serovariedades de *Salmonella enterica*; Enteritidis es la que con más frecuencia se aísla de individuos con enterocolitis y de niños con diarreas bacterianas. En nuestro laboratorio se construyen y utilizan mutantes atenuadas de *S. Enteritidis* para el estudio de la patogénesis de las infecciones por *Salmonella* y como prototipos de cepas vacunas experimentales.
  
- ✓ La generación de cepas atenuadas de *S. Typhimurium* por mutación del gen *dam* ha sido ampliamente estudiada. Las mutantes carentes de proteína Dam son altamente inocuas en el modelo murino: i) no interaccionan con la mucosa intestinal, ii) no invaden el epitelio intestinal y iii) prácticamente no colonizan al animal inmunizado. La inmunidad protectora que las mutantes *dam* confieren al animal inmunizado se relaciona con la enorme cantidad y variedad de antígenos liberados en el epitelio intestinal, como consecuencia de la desregulación de la síntesis y secreción proteica. Lamentablemente, la incapacidad de interactuar con el epitelio intestinal y el defecto en alcanzar los tejidos linfoides, impiden el uso de estas cepas vacunales como vehículos de antígenos heterólogos que deben ser liberados en el citoplasma de la célula eucariota.
  
- ✓ La inserción de un mini transposón en los últimos nucleótidos del gen *dam* da origen a una cepa de *S. Typhimurium* portadora de una proteína Dam con características termosensibles (Dam ts). Esto es, una bacteria con fenotipo salvaje a 28 °C y *dam* (-) a 37 °C.
  
- ✓ Contrariamente a lo que ocurre con la serovariedad Typhimurium, las mutantes *dam* de *S. Enteritidis* han sido muy poco investigadas.

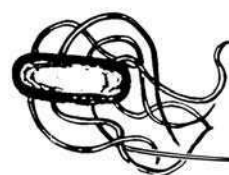
## Interrogante:

¿Qué ventaja tendría una cepa de *Salmonella* portadora de una proteína Dam ts sobre una cepa carente de dicha enzima?

Si pensamos en una cepa de *Salmonella* portadora de una proteína Dam ts como un prototipo de vacuna, la ventaja sobre la cepa vacunal carente de Dam podría explicarse como sigue:

Cultivada a 28 °C e inoculada a un animal de sangre caliente, la cepa con una proteína Dam ts se comportará como una cepa virulenta durante las primeras etapas de la infección, hasta que la temperatura corporal del animal afecte el funcionamiento de la enzima Dam. Así, la inmunización con una cepa portadora de una proteína Dam ts generaría respuesta inflamatoria del epitelio intestinal y colonización de los tejidos, autolimitadas.

Si consideramos la cepa con una proteína Dam ts como vector, para el estudio de transporte y secreción de antígenos heterólogos, entonces la capacidad de penetrar en el tejido tanto intestinal como linfoide, cobra vital importancia.



## *Introducción*

---

# Introducción

## El género *Salmonella*

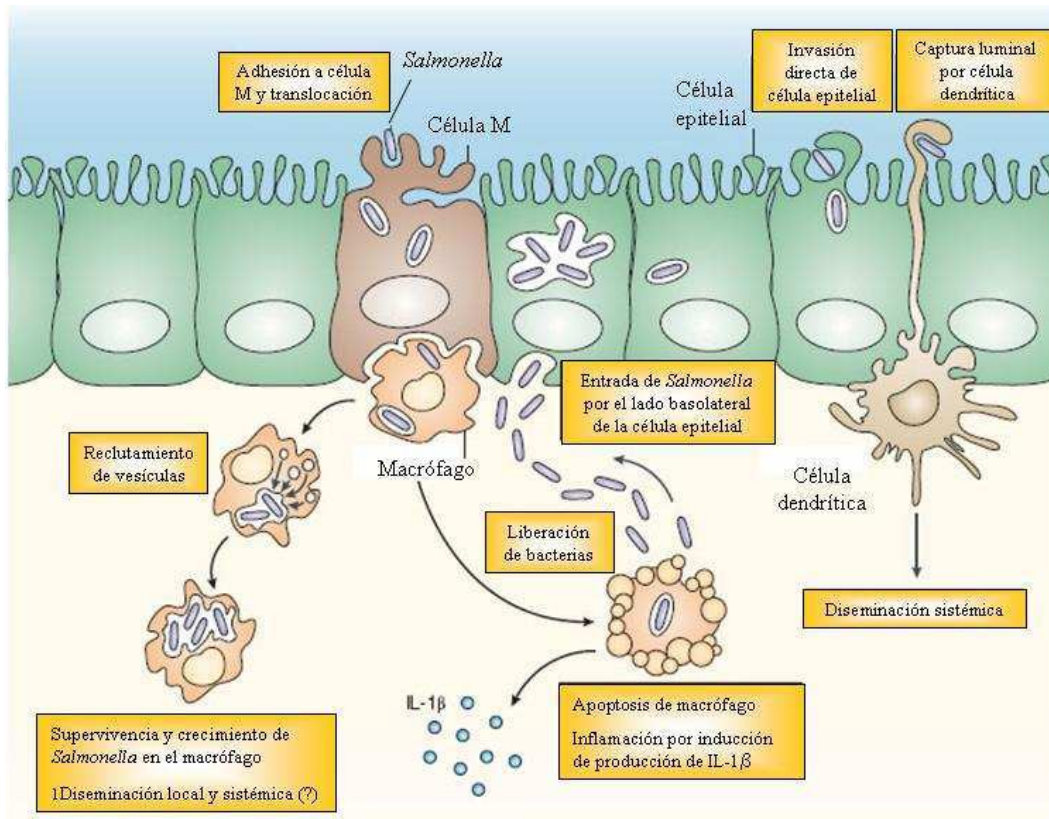
Este género, integrante de la familia de las enterobacterias, está compuesto por bacilos gram-negativos capaces de producir enfermedad tanto en humanos como en animales. La taxonomía de *Salmonella* puede ser confusa; se han descrito más de 2.500 serovariedades, todas ellas son miembros de una única especie, *Salmonella enterica*. En el humano, sin embargo, las infecciones por *Salmonella* se limitan a unas pocas serovariedades. Typhi y Paratyphi son las que con más frecuencia causan fiebres entéricas, mientras que serovariedades como Newport, Javiana, Typhimurium, Enteritidis, entre otras, causan infección intestinal localizada. La serovariedad Enteritidis es la que con más asiduidad causa infecciones relacionadas con alimentos contaminados y es la que con mayor frecuencia se aísla de los enfermos con gastroenteritis (Linam W.M. y M.A. Gerber, 2007). La gastroenteritis por *Salmonella* es la forma más común de salmonelosis y generalmente requiere un período de incubación de 8 a 48 horas, que puede extenderse hasta 5 días. Los síntomas incluyen náuseas, vómitos y diarreas. Como se dijo anteriormente, *S. Enteritidis* es la serovariedad que se aísla con más frecuencia (Chambers H.F. y col., 2008; Center for Disease Control and Prevention, Apr 2008). *Salmonella* spp. tiene una amplia distribución en el ambiente, y ciertos factores inherentes al huésped hacen que el humano sea particularmente susceptible a la infección. Su creciente resistencia a los antibióticos, su virulencia y su adaptabilidad son desafíos actuales a nivel mundial (Centers for Disease Control and Prevention, May 2008).

## Fisiopatología

Por lo general, la infección por *Salmonella* comienza por la ingestión de la bacteria presente en alimentos o agua contaminada. No obstante, el contacto directo con animales o humanos portadores puede ser también una vía de transmisión. Los reptiles y los anfibios colonizados son una de las fuentes de infección, por contacto directo, más frecuente reconocidas (Linam W.M. y M.A. Gerber, 2007). A partir de estudios realizados con humanos voluntarios se demostró que para producir enfermedad se requiere una dosis de un millón de bacterias, aproximadamente. Sin embargo, algunos

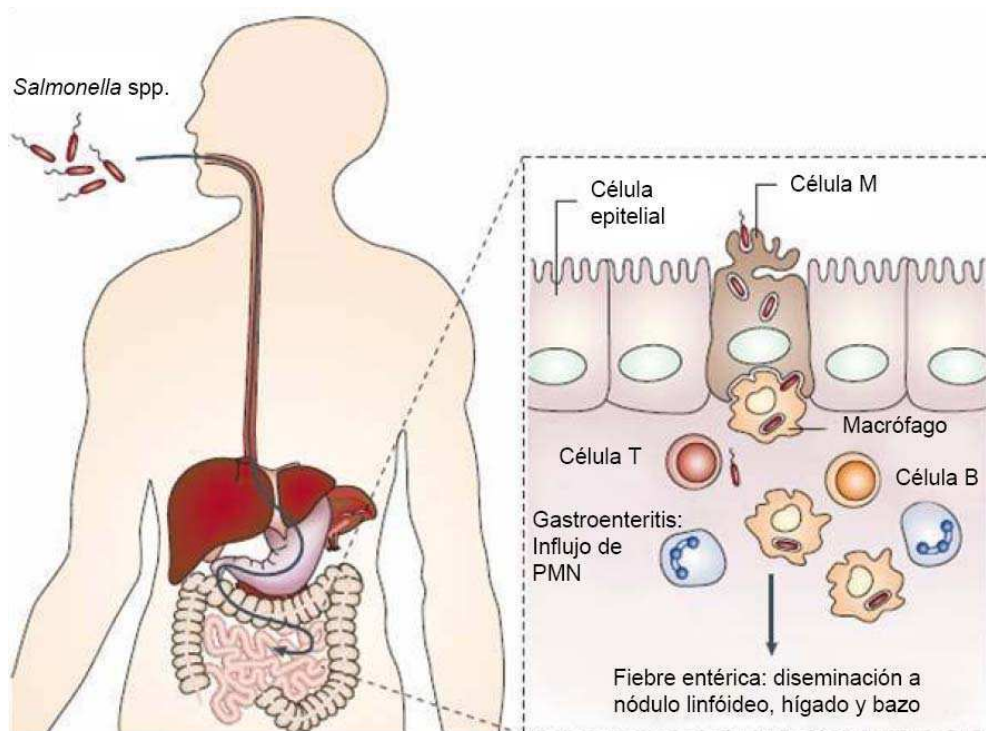
brotes ocurridos recientemente sugieren que en dosis tan bajas como 200 bacterias, *Salmonella* puede causar gastroenteritis (Peques D.A. y col., 2005).

Una vez que la bacteria superó la barrera ácida del estómago, coloniza el intestino y atraviesa el epitelio intestinal por algunas de estas vías: (1) invasión de los enterocitos, (2) invasión de las células M, y (3) a través de las células dendríticas (Fig. 1. 1).



**Figura 1. 1. Estrategias que le permite a *Salmonella* spp. atravesar la barrera intestinal, sobrevivir en tejidos de intestinos y esparcirse sistémicamente.** *Salmonella* spp. atraviesa la célula M del folículo asociado al epitelio mayoritariamente en las placas de Peyer de la porción ileal del intestino delgado pero posiblemente también del colon. Aquí *Salmonella* spp. puede causar la apoptosis de macrófagos y activar la inflamación. *Salmonella* spp. también genera la modificación de la vacuola a vacuola contenedora de *Salmonella* (VCS) permitiéndole la supervivencia y multiplicación. Esto le provee a la bacteria la capacidad de invadir células epiteliales y diseminarse sistémicamente. Alternativamente, la bacteria puede también entrar a las células intestinales por el lado apical de la célula o ser capturadas por células dendríticas que emiten pseudópodos por entre las células epiteliales. El último proceso, promueve la diseminación sistémica de *Salmonella* spp. IL-1β, interleukin-1β.

La interacción con el epitelio intestinal y células residentes promueve una respuesta inflamatoria que incluye la participación de citoquinas, quimioquinas, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, y linfocitos T y B (Grassi G.A. y B.B. Finlay, 2008). Luego de atravesar el epitelio, la bacteria puede replicar en macrófagos, placas de Peyer, ganglios mesentéricos, hígado y bazo (Fig. 1. 2). A partir de esta colonización, la bacteria puede diseminarse hacia otros órganos como pulmones, vesícula, riñones o sistema nervioso central. Las serovariedades no-tifoideas de *Salmonella* producen una respuesta más localizada, mientras que las serovariedades Typhi o Paratyphi pueden desarrollar una patología más invasiva que involucre bacteriemia. La severidad de las infecciones causadas por *Salmonella* está relacionada con la serovariedad, el número de microorganismos y condiciones predisponentes del huésped.



**Figura 1. 2. Biología de la infección por *Salmonella* spp.** A partir de la ingestión de una dosis de aproximadamente  $10^6$  bacterias, *Salmonella* puede tener acceso al epitelio intestinal. El patógeno invade el epitelio preferentemente a través de las células M, aunque tiene capacidad para invadir los enterocitos. Una vez cruzado el epitelio, los serotipos de *Salmonella* spp. que están asociados a la enfermedad sistémica ingresan dentro de macrófagos o células dendríticas intestinales y se diseminan a través del sistema retículoendotelial. Por el contrario, las serovariedades de *Salmonella* no tifoidea inducen una respuesta inflamatoria temprana local la cual resulta en la infiltración de polimorfonucleares (PMN) en el lumen intestinal y en diarrea.

Los huevos y otros productos avícolas son las fuentes más comunes de infección (Braden C.R., 2006; Linam W.M. y M.A. Gerber, 2007). También son vías de infección frecuente la ingestión de agua, leche y productos lácteos sin pasteurizar, frutas y vegetales. En los niños, el contacto con mascotas (tortugas, reptiles) y con carne de pollo cruda (especialmente cuando se transporta a los niños en el carrito del supermercado) son potenciales fuentes de contagio (Jones T.F. y col., 2006). Recientemente, en varios estados de los Estados Unidos tuvieron lugar brotes de salmonelosis humana asociados a salsas de tomates y productos a base de manteca de maní, contaminados (Centers for Disease Control and Prevention, May 2008 y Feb 2009).

Los reservorios de la bacteria varían según la serovariedad e incluyen a los humanos, aves, cerdos, ganado, roedores y mascotas tales como iguanas, tortugas, pollitos, perros y gatos. En un 90 % de los casos, los reptiles y los anfibios portan *Salmonella* en su tracto gastrointestinal y un 6 % de las infecciones no tifoideas están directamente relacionadas al contacto con esos animales (Linam W.M. y M.A. Gerber, 2007). La transmisión fecal-oral de persona a persona, en áreas de condiciones sanitarias precarias o sin agua potable, es la ruta de infección de la fiebre entérica. El humano es el único reservorio conocido de *S. Typhi* (Linam W.M. y M.A. Gerber, 2007). La susceptibilidad del individuo a las infecciones por *Salmonella* aumenta en los extremos de la vida, en los estados de inmunodeficiencia, terapia antibiótica previa, enfermedades neoplásicas, aclorhidria o uso de antiácidos, cirugía intestinal y desnutrición (Centers for Disease Control and Prevention, Apr 2008).

### **Prevención de las infecciones por *Salmonella*: Vacunas**

Si se considera que *Salmonella* constituye una de las principales causas de infecciones a través de alimentos, la mayor frustración del siglo XXI, en este aspecto, es no contar con una vacuna. En efecto, los requerimientos de una buena vacuna contra *Salmonella* spp. son todavía un punto clave de discusión; la selección de la cepa vacuna es empírica y la razón para el éxito o fracaso de la vacuna no es clara. Hoy se acepta que las vacunas inactivadas, convencionales, de *Salmonella* spp., no inducen máxima protección y causan reacciones colaterales no deseadas. Por el contrario, las cepas vivas atenuadas proveen una mejor protección y generan tanto inmunidad mediada por células como una buena respuesta humoral. En la actualidad se cuenta con vacunas atenuadas contra la



fiebre tifoidea, sin embargo es deseable y necesario mejorar aspectos relacionados con la dosis, la inmunogenicidad y la tolerancia (Jain S.K., 2009).

En nuestro laboratorio se construyen mutantes atenuadas de *S. Enteritidis* que se utilizan en el estudio de la patogénesis de las infecciones y como prototipos de cepas vacunas experimentales (Cerquetti M.C. y col., 2000a, 2000b y 2002).

La construcción de mejores cepas atenuadas de *Salmonella* tiene un gran potencial, no sólo como vacunas contra salmonelosis, sino también como transportes o vehículos de antígenos heterólogos y en terapia génica. Esta estrategia ha demostrado ser exitosa en modelos animales en los que se observó la inducción de respuesta antígeno-específica humoral, celular y de mucosas. Lamentablemente, las pruebas clínicas hasta el momento no han arrojado resultados convincentes (Galen J.E. y col., 2009). Por lo tanto, el diseño de cepas atenuadas de *Salmonella* como vectores eficientes para el desarrollo de mejores vacunas es actualmente un área de intensiva investigación. En este sentido, la mayor eficiencia de la cepa-vector se basa particularmente en su habilidad para transportar y liberar suficiente cantidad del antígeno al interior de las células del tejido adecuado. Resultan sumamente atractivos los sistemas de secreción que las bacterias gram negativas, como *Salmonella*, han desarrollado para transportar antígenos bacterianos al interior de la célula eucariota (Rüssmann H., 2003). La modificación genética de estos sistemas de secreción es una alternativa potencial para diseñar vectores de transporte y liberación de antígenos heterólogos y citoquinas (Chamekh M., 2009).

### **Mutantes *dam* de *Salmonella***

Una de las estrategias de atenuación de *Salmonella* que concentró mayor atención en los últimos años fue la desregulación de la metilación del ADN por la enzima Dam (el funcionamiento de esta proteína se detalla más adelante).

La disminución de la virulencia en las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* es muy significativa. Los valores de DL<sub>50</sub> de la mutante son al menos 1.000 a 10.000 veces más altos que los de la cepa virulenta; esto es para ratones BALB/c inoculados oral o intraperitonealmente (García del Portillo F. y col., 1999). En pollos de un día de edad, una mutante *dam* de *S. Typhimurium* resultó 100.000 veces más atenuada que la cepa salvaje (Dueger E.L. y col., 2001).

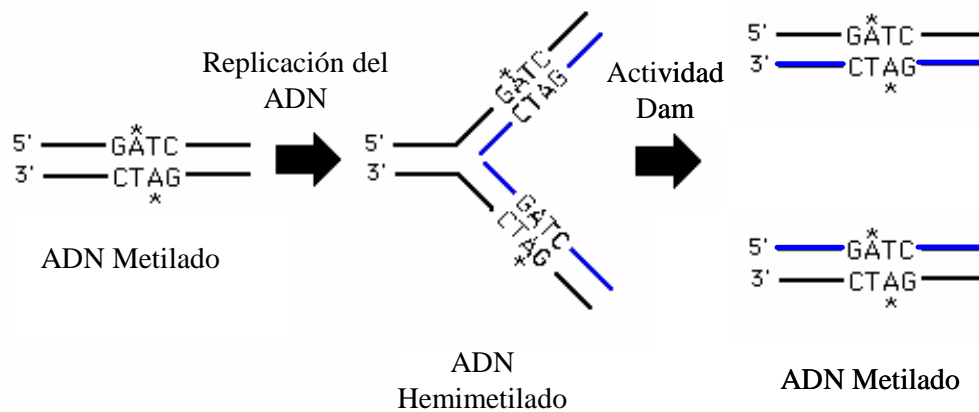
Igualmente remarcable es la capacidad de las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* para inducir, en el modelo murino, inmunidad protectora. La inmunización oral con una dosis entre  $10^8$ - $10^9$  UFC de la mutante *dam* protege entre el 80 a 100 % de los ratones BALB/c desafiados con 160 DL<sub>50</sub> de la cepa virulenta (García del Portillo F. y col., 1999).

Por las características descritas, las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* han sido propuestas como “vacunas ideales” y se ha incentivado la construcción y el estudio de mutantes *dam* en otras especies bacterianas. En nuestro laboratorio se ha generado una mutante *dam* de *S. Typhimurium* por transposición que presenta un fenotipo termosensible tanto para el crecimiento bacteriano como para la actividad de la proteína Dam (Brawer R. y col., 1998).

### **Metilación del ADN y la proteína ADN Adenina Metiltransferasa (Dam)**

En diversos grupos de protobacterias se produce la metilación de residuos de desoxiadenosina (Barras F. y M.G. Marinus, 1989, Casadesús J. y J. Torreblanca, 1996; Marinus M.G., 1996; Reisenauer A. y col., 1999a y 1999b). La enzima ADN adenina metiltransferasa (Dam) metila residuos de adenina en sitios 5'-GATC-3' de cadena doble del ADN a 6-metil-adenina (Brooks J.E. y col., 1983; Lyngstadaas A. y col., 1995; Palmer B.R. y M.G. Marinus, 1994; Wion D. y J. Casadesús, 2006), usando como dador de metilo la S-adenosilmetionina (Hattman S. y col., 1978; Lacks S. y B. Greenberg, 1977) (Fig. 1. 3).

La metilación por Dam es post-replicativa y causa cambios en la estructura del ADN que puede influenciar y controlar la interacción entre la ARN polimerasa o proteínas reguladoras y su sitio de unión del ADN correspondiente (Bolker M. y R. Kahmann, 1989; Campbell J.L. y N. Kleckner, 1990; García del Portillo F. y col., 1999; Sternberg N. 1985; Low D.A. y col., 2001).

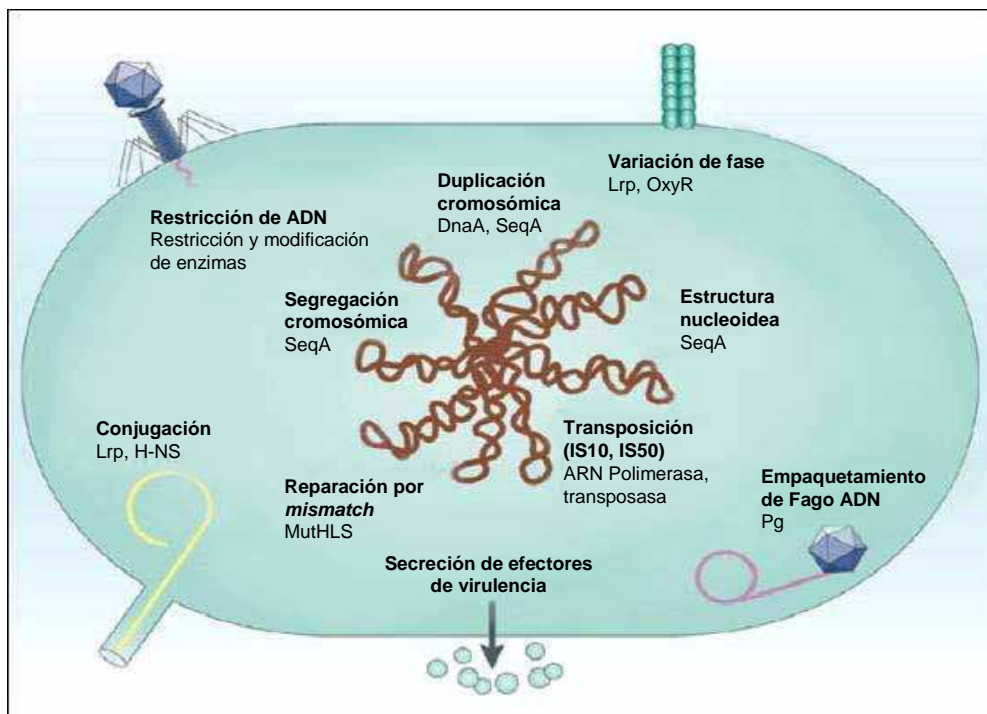


**Figura 1. 3. Acción de la enzima Dam.** La enzima Dam agrega un grupo metilo al residuo de adenina perteneciente a la secuencia 5'-GATC-3' de ADN doble cadena. Debido a que la secuencia se encuentra presente a ambos lados de la doble cadena de ADN, ambas cadenas de ADN son metiladas dentro de la secuencia GATC doble cadena. Sin embargo, cuando la secuencia es copiada durante la replicación del ADN, sólo una hebra, la derivada de la parental, permanece metilada. El estado en el cual una hebra se encuentra metilada y la otra no, se denomina estado de hemimetilación. A la enzima, le lleva 1 a 2 min. agregar un grupo metilo a la otra hebra para restaurar el estado de metilación completo.

### Efecto regulatorio de la metilación por Dam

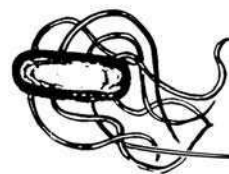
En gammaproteobacterias la ADN adenine metiltransferasa introduce un grupo metilo en la posición N6 terminal de la adenina en la secuencia GATC de la nueva hebra de ADN sintetizada hemimetilada luego de la replicación, generando ADN metilado (Løbner-Olesen A. y col., 2005; Low D.A. y col., 2001; Marinus M.G., 1996; Wion D. y J. Casadesús, 2006). En ciertos sitios GATC, la metilación de la nueva hebra sintetizada es impedida por la unión de proteínas que protegen al sitio GATC de la Dam metilasa. La protección a la metilación, puede causar un retraso temporal en la metilación o generar sitios GATC hemimetilados o no metilados estables (Low D.A. y col., 2001; Wion D. y J. Casadesús, 2006). Por lo tanto, el estado de metilación del ADN puede afectar las interacciones entre el ADN y proteínas, tales como la ARN Polimerasa o factores de transcripción (Wion D. y J. Casadesús, 2006), que regulan (activan o reprimen) la expresión génica.

El estado de metilación de uno o más sitios GATC críticos, pueden servir como señal para coordinar la iniciación de la replicación del ADN (Løbner-Olesen A. y col., 2005; Boye E. y A. Løbner-Olesen, 1990; Campbell J.L. y N. Kleckner, 1990), modular procesos celulares como reparación por *mismatch* (Radman M. y R. Wagner, 1986.), transposición de elementos de inserción (Roberts D. y col., 1985), síntesis de fimbrias (Braaten B.A. y col., 1994; Nicholson B. y D. Low 2000; Van der Woude M.W. y col., 1996; Van der Woude M.W. y Low D.A. 1994), conjugación bacteriana (Torreblanca J. y col., 1999; Torreblanca J. y J. Casadesús, 1996) y segregación cromosómica (García del Portillo F. y col., 1999; Mahan M.J. y D.A. Low, 2001; Marinus M.G., 1996) (Fig. 1. 4).



**Figura 1. 4. Procesos celulares en que participa Dam.** La proteína DNA adenina metiltransferasa (Dam) es un regulador global de la expresión génica en bacterias y modula una gran variedad de procesos celulares fundamentales: Defensa bacteriana contra bacteriófagos y transposones; regulación de la replicación cromosómica, segregación de cromosoma y reorganización del núcleo luego de la replicación del ADN; discriminación de la hebra de ADN para la reparación por *mismatch*; regulación de la transferencia de plásmidos conjugativos; empaquetamiento de ADN fagmídico dentro de la cápside; y regulación transcripcional de operones fímbricos y otros genes de virulencia. Se marcan las proteínas de unión a ADN sensibles a metilación conocidas involucradas en cada proceso (Wion D. y J. Casadesús, 2006).

Dadas las múltiples funciones que regula la metilación del ADN, no es sorprendente que las mutaciones *dam* sean altamente pleiotrópicas. En *E. coli* y *Salmonella* spp., su ausencia no afecta la viabilidad de la célula (García del Portillo F. y col., 1999). Sin embargo, en varias proteobacterias de la subdivisión alfa, incluyendo *C. crescentus*, *R. meliloti*, *B. abortus*, y *A. tumefaciens* la presencia de metiltransferasa CcrM resulta indispensable para la viabilidad (Kahng L.S. y L. Shapiro, 2001; Robertson G.T. y col., 2000; Stephens C. y col., 1996; Wright R. y col., 1997). Por lo tanto, al ser esta proteína esencial para la virulencia de las bacterias o viabilidad en varios patógenos (Low D.A. y col., 2001; Mahan M.J. y D.A. Low, 2001), la desregulación de la metilación por Dam es un blanco interesante para el desarrollo de drogas antimicrobianas (Steven J.M. y col., 2001).



## *Hipótesis y Objetivos*

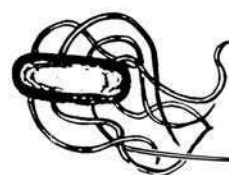
---

## Hipótesis y objetivos

**Hipótesis.** Si se inocula en un animal de sangre caliente, la mutante de *Salmonella* portadora de una proteína Dam ts (cultivada a 28 °C) se comportará como una cepa virulenta hasta que la temperatura corporal del animal afecte el funcionamiento de la enzima Dam. De esta manera, se generará una respuesta inflamatoria del epitelio intestinal y una colonización de los tejidos, autolimitadas.

Para demostrar nuestra hipótesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción y caracterización de una cepa de *S. Enteritidis* con fenotipo Dam termosensible (mutante SD1).
2. Determinación de la atenuación de la mutante SD1.
3. Análisis de la interacción de la mutante SD1 con la mucosa intestinal y órganos internos.
4. Determinación de la capacidad protectora de la mutante SD1 en modelos animales de inmunización y desafío.



*Desarrollo  
Experimental*

---



# Desarrollo Experimental

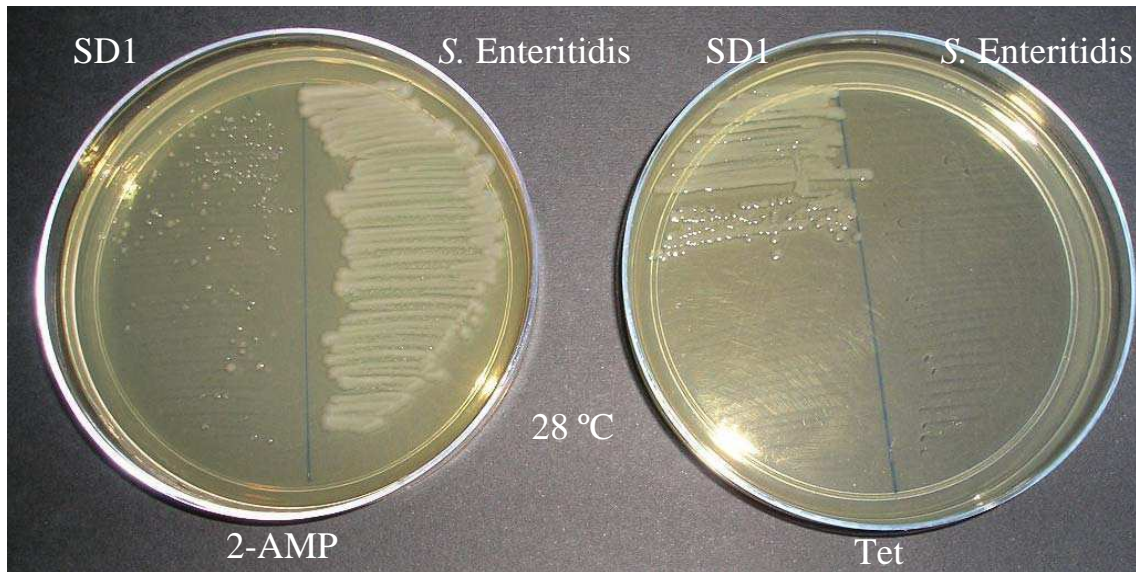
## 1. Obtención de la mutante SD1 de *S. Enteritidis* con fenotipo Dam termosensible

La mutante *dam* de *S. Enteritidis* SD1 se obtuvo mediante la transducción de la inserción *dam-231::Tn10dTet* de la cepa D220 de *S. Typhimurium* a la cepa virulenta de *S. Enteritidis* #5694. Las colonias transductantes que desarrollaron en las placas de tetraciclina (Tet) se sembraron en réplica en placas de 2-aminopurina (2-AMP), Tet y TSA y fueron incubadas a 28 °C y 37 °C. Aquellas colonias que mostraron buen crecimiento en Tet y TSA a 28 °C y sensibilidad a la 2-AMP, se seleccionaron para posteriores estudios. Así se seleccionó la cepa SD1 que es el objeto de análisis del presente capítulo.

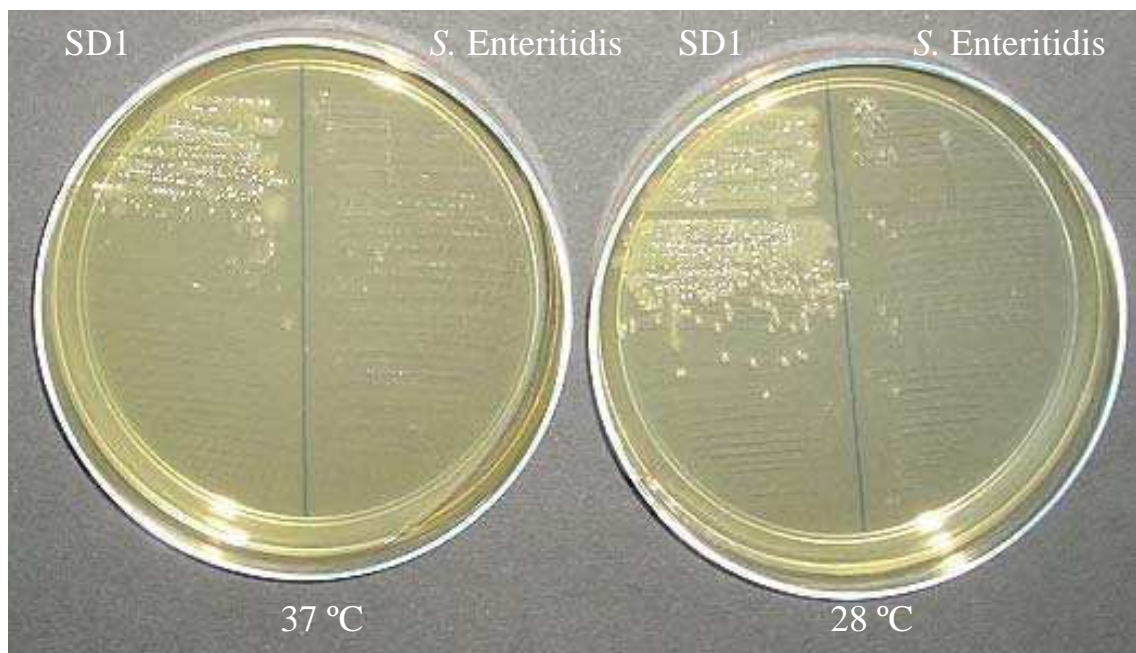
## 2. Caracterización de la mutante SD1 de *S. Enteritidis*

### 2. 1. Crecimiento en medio sólido

La mutante SD1 se sembró en aislamiento, en placas de Tet, 2-AMP y TSA las que se incubaron a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en las Fotos 1. 1 y 1. 2. En las placas con Tet a diferentes temperaturas (Foto 1. 1) se pudo observar el crecimiento y la termosensibilidad de la cepa SD1. Se observó muy poco crecimiento en la última estría de la placa incubada a 37 °C en comparación con la primera estría de la placa incubada a 28 °C. A su vez el crecimiento de la cepa SD1 en la placa con Tet incubada a 28 °C fue similar al crecimiento de la cepa control de *S. Enteritidis* en placas TSA (no mostrado). Por otro lado, se pudo observar que la cepa SD1 es altamente sensible a 2-AMP ya que no presentó crecimiento en las placas que contenían este análogo de base (Foto 1. 2).



**Foto 1. 1. Fenotipo de la cepa mutante SD1 en agar con Tet.** Desarrollo de la mutante SD1 luego de 18 hs. de incubación a 37 °C y 28 °C en placas con Tet. En el sector derecho de las placas se incluyó como control de crecimiento a la cepa parental de *S. Enteritidis*.

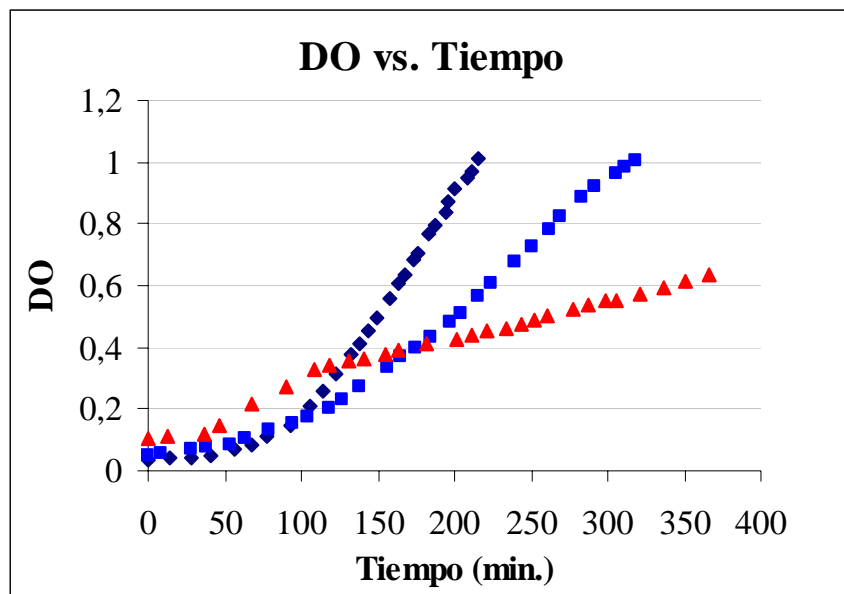


**Foto 1. 2. Fenotipo de la cepa mutante SD1 en agar con 2-AMP.** Desarrollo de la mutante SD1 luego de 18 hs. de incubación a 28 °C en placas con 2-AMP (placa izquierda) y en placas con Tet (placa derecha). En el sector derecho de las placas se incluyó como control de crecimiento a la cepa parental de *S. Enteritidis*.

## 2. 2. Crecimiento en medio líquido

### 2.2.1. Curva de DO vs. Tiempo

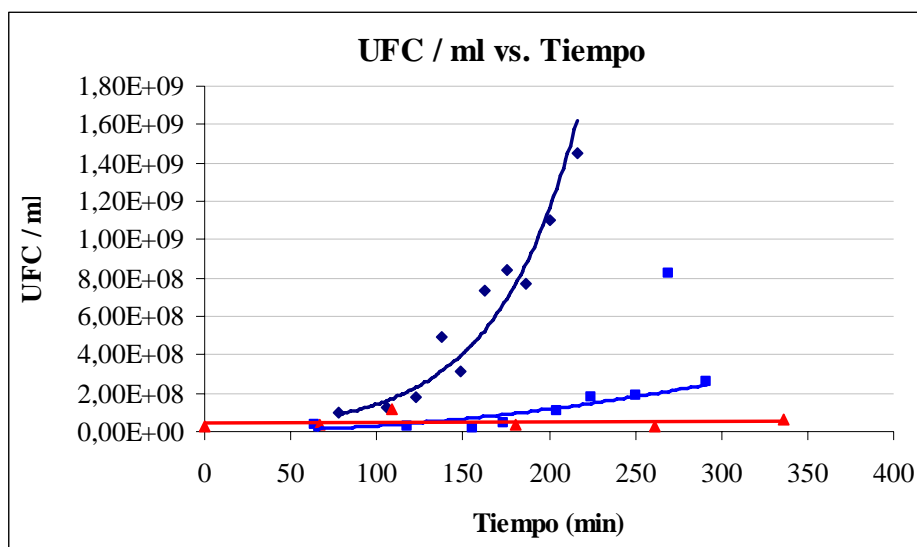
El crecimiento de la mutante SD1 en medio líquido a diferentes temperaturas se analizó graficando la densidad óptica del cultivo a 600 nm en función del tiempo. Las curvas obtenidas se muestran en la Fig. 1. 5. Las pendientes de las rectas muestran que a 28 °C la mutante SD1 tiene una velocidad de crecimiento mayor comparado con su crecimiento a 37 °C. Puede observarse también, que la cepa SD1 crece a menor velocidad que la cepa parental, a cualquier temperatura de incubación.



**Figura 1. 5. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la mutante SD1.** Curva de crecimiento de la cepa SD1 cultivada a 28°C (■) y 37 °C (▲) y de *S. Enteritidis* cultivada a 28 °C (◆).

### 2. 2. 2. Curvas de viabilidad

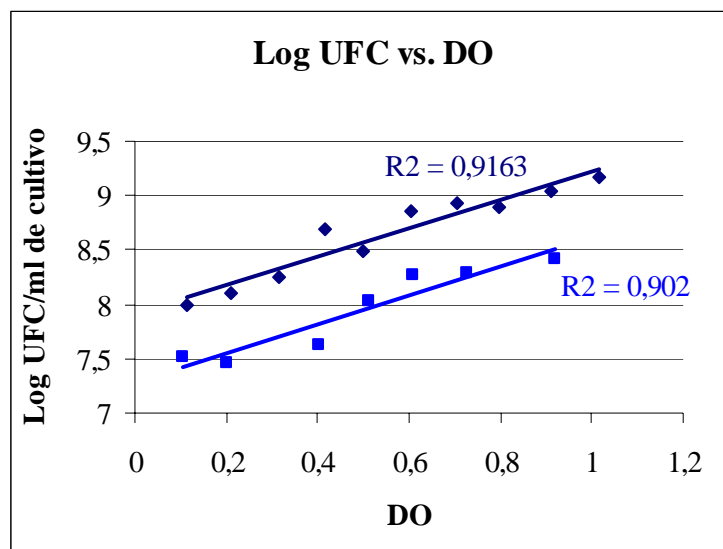
Se analizó la viabilidad de la mutante a diferentes temperaturas de cultivo. Para ello se graficó el número de UFC / ml de cultivo, a 28 °C y 37 °C, en función del tiempo. Los resultados se muestran en la Fig. 1. 6. Resulta evidente que la viabilidad de la mutante SD1 se afecta con la temperatura. En verdad, a diferencia de lo observado con la DO (Fig. 1. 5), los valores de UFC / ml a 37 °C no se modifican notablemente a lo largo del período de incubación.



**Figura 1 .6. Efecto de la temperatura sobre la densidad bacteriana.** Viabilidad de la mutante SD1 cultivada a 28 °C (■) y 37 °C (▲) y de la cepa salvaje de *S. Enteritidis* cultivada a 28 °C (◆). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas del cultivo, las que fueron diluidas apropiadamente para la siembra en placa y el posterior recuento de UFC.

### 2. 2. 3. Curva de densidad bacteriana vs. DO

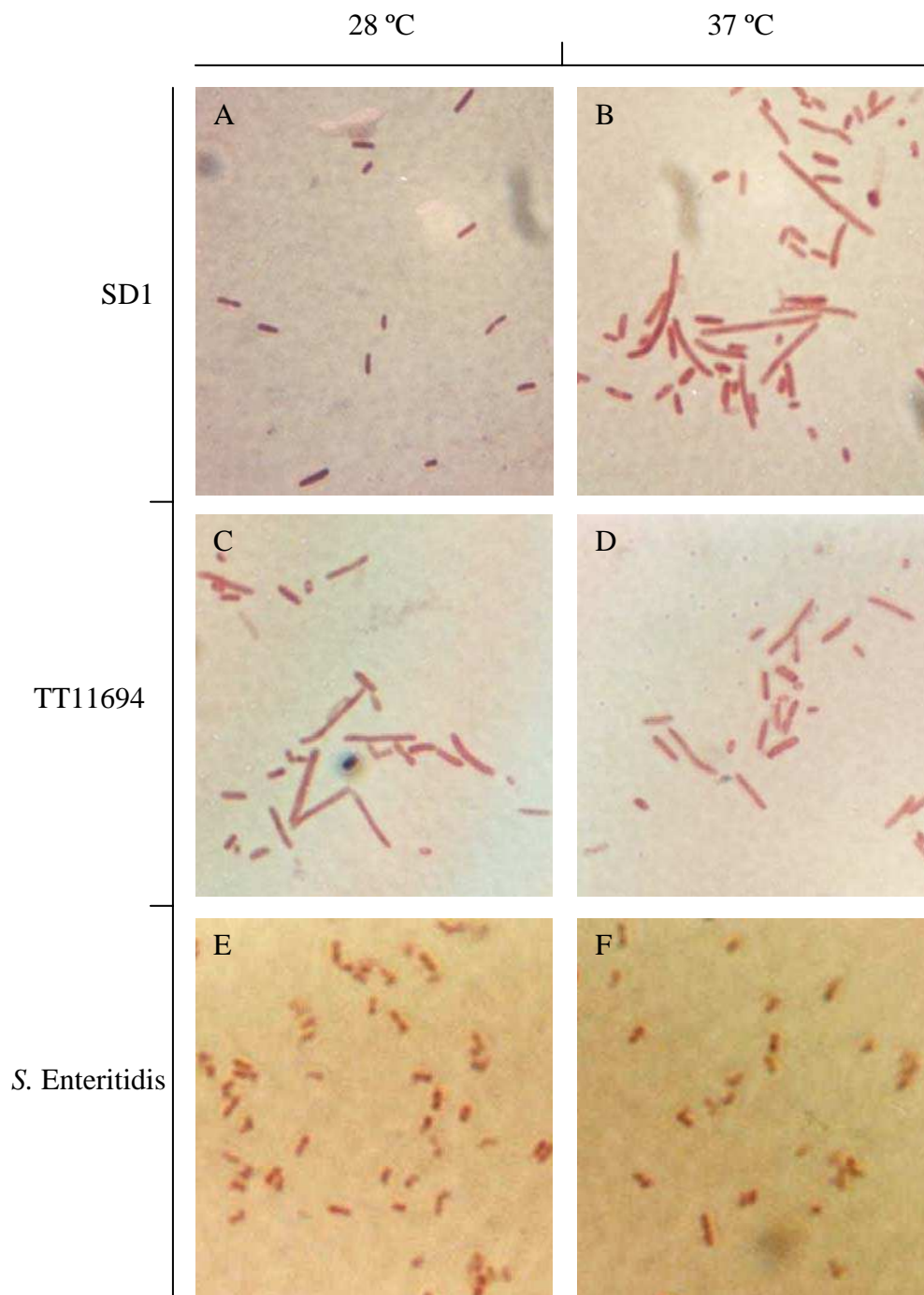
La curva de UFC en función de la DO (Fig. 1. 7) nos permite realizar, por extrapolación, un cálculo aproximado de la densidad bacteriana de un cultivo conociendo su turbidez a 600 nm. El número exacto de UFC / ml del cultivo se obtiene luego por siembra de diluciones apropiadas en placas de agar. Esta metodología se utilizó a lo largo de este trabajo para la preparación de las suspensiones bacterianas inoculadas a los animales.



**Figura 1. 7. Correlación entre el Log. UFC y la DO.** Log UFC / ml de cultivo de la mutante SD1 cultivada a 28 °C (■) y de la cepa salvaje cultivada a 37 °C (◆). La absorbancia del cultivo a 600 nm fue determinada a diferentes tiempos y se tomaron alícuotas, las que se diluyeron apropiadamente para la siembra en placa y recuento.

### 2. 3. Morfología

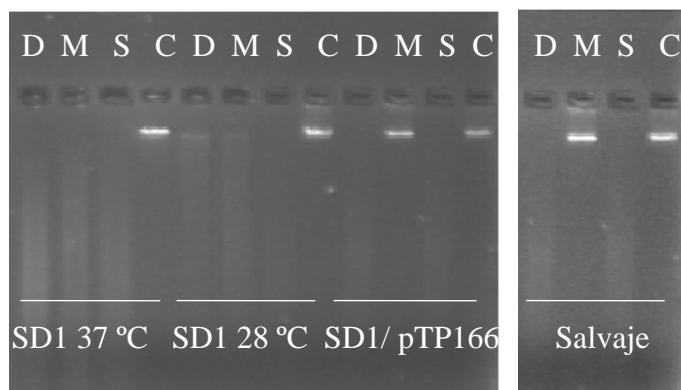
Se analizó la morfología de la mutante SD1, de muestras provenientes de cultivos en medio líquido a las distintas temperaturas. La cepa mutante SD1 al ser cultivada a 28 °C muestra una morfología similar a la cepa salvaje, aunque de mayor tamaño (Foto 1. 3 A y C). Sin embargo, el cambio morfológico más drástico se observó en la mutante cultivada a mayor temperatura. Se encontró que la mutante SD1 forma filamentos de tamaño heterogéneo a 37 °C (Foto 1. 3 B). Nótese la diferencia con la mutante TT11694 de *S. Typhimurium* (la cual carece totalmente de la proteína Dam) que filameta tanto a 28 °C como a 37 °C (Foto 1. 3 C y D).



**Foto 1. 3. Morfología de la mutante *dam* SD1.** La fotomicrografía muestra la morfología de las mutantes SD1 y TT11694, y de la cepa salvaje de *S. Enteritidis* #5694 cultivadas en medio TSB por 120 min. a 28 °C (A, C y E respectivamente) ó 37 °C (B, D y F respectivamente). Tinción de Gram, Aumento: 100X.

## 2. 4. Estado de metilación del ADN de la cepa SD1

Nos interesó conocer el estado de metilación del ADN de las cepas *dam* SD1 y TT11694, de la cepa complementada SD1 / pTP166 y de la cepa salvaje de *S. Enteritidis*. Se observó que el ADN de todas las cepas fue digerido por la enzima *Sau3AI*, que corta el ADN en secuencias GATC, independientemente del estado de metilación (Fig. 1. 8). Sólo el ADN de las cepas *dam* (SD1 y TT11694) fue digerido con *MboI*, la cual reconoce residuos de adenina no metilados. El ADN de todas las cepas, excepto TT11694, fue digerido con la enzima *DpnI*, la cual requiere residuos de adenina de secuencia GATC metilados. El patrón de metilación del ADN de la cepa SD1 revirtió cuando esta fue complementada con el plásmido pTP166, indicando que las diferencias observadas entre la SD1 y la cepa parental se deben a una proteína Dam defectuosa. Esta metodología no permite observar diferencias en el patrón de digestión de ADN de la mutante SD1 cultivada a 28 ó 37 °C.



**Figura 1. 8. Digestión diferencial.** La cepa SD1 fue cultivada a 28 °C y a 37 °C y las cepas SD1/pTP166 y salvaje de *S. Enteritidis* fueron crecidas a 37 °C. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Se extrajo el ADN total mediante un *kit* comercial y posteriormente se digirió con enzimas de restricción. *DpnI* (calles D) (digiere ADN metilado), *MboI* (calles M) (corta ADN no metilado) y *Sau3AI* (calles S) (digiere el ADN independientemente del estado de metilación), ADN control (calles C) (ADN sin digerir). Los resultados son representativos de tres experimentos realizados.



## Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten concluir que la mutante SD1 de *S. Enteritidis* presenta las características de sensibilidad a 2-AMP y termosensibilidad encontradas en la cepa dadora de la inserción D220 (Brawer R, y col., 1998). La filamentación observada sólo a 37 °C indica que la actividad de la proteína Dam se afecta por la temperatura. La filamentación, además, explicaría, en parte, las diferencias encontradas en las curvas de viabilidad a las distintas temperaturas de incubación. La recuperación del patrón de metilación del ADN en la cepa SD1 complementada, corrobora que a 37 °C la mutante SD1 presenta una proteína Dam defectuosa.

### 3. Determinación de la atenuación de la mutante SD1

Las mutantes de *Salmonella* spp. que carecen totalmente de actividad Dam, son altamente inocuas (Heithoff D.M. y col., 2001, García del Portillo F. y col., 1999; Low D.A. y col., 2001). Para analizar si la delección en los últimos 10 aminoácidos de la proteína Dam genera atenuación en la mutante SD1, se determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), es decir aquella dosis de bacteria capaz de producir la muerte en la mitad de la animales inoculados. Se utilizaron distintas rutas de administración: vía oral (v. o.), intragástrica (i.g.) e intraperitoneal (i.p.). Los resultados indicaron que la DL<sub>50</sub> de la cepa SD1 es notablemente superior a la de la cepa salvaje, por cualquiera de las vías de inoculación estudiadas (Tabla 1. 1). Para confirmar que la atenuación en la virulencia se debía exclusivamente a una proteína Dam defectuosa, la cepa SD1 se transformó con el plásmido pIZ833 que contiene el gen *dam* salvaje. Se observó que la cepa complementada recuperó su virulencia (Tabla 1. 2 en Materiales y Métodos).



**Tabla 1. 1. Determinación de la DL<sub>50</sub>.**

Cepa bacteriana	DL <sub>50</sub>		
	Oral	Intragástrica	Intraperitoneal
SD1	>10 <sup>9</sup> UFC / ratón	>10 <sup>9</sup> UFC / ratón	>10 <sup>5</sup> UFC / ratón
SD1 / pIZ833	ND <sup>a</sup>	6 x 10 <sup>5</sup> UFC / ratón	<60 UFC / ratón
<i>S. Enteritidis</i> #5694	2 x 10 <sup>4</sup> UFC / ratón	1,7x10 <sup>4</sup> UFC / ratón	<10 UFC / ratón

Los ratones se inocularon con diferentes dosis de la mutante SD1, de la cepa transformada SD1 / pIZ833 y de la cepa salvaje de *S. Enteritidis* #5694. La DL<sub>50</sub> se calculó por el método de Reed L.J. y H. Muench (1938).

<sup>a</sup>ND: no determinado.

### Conclusión parcial

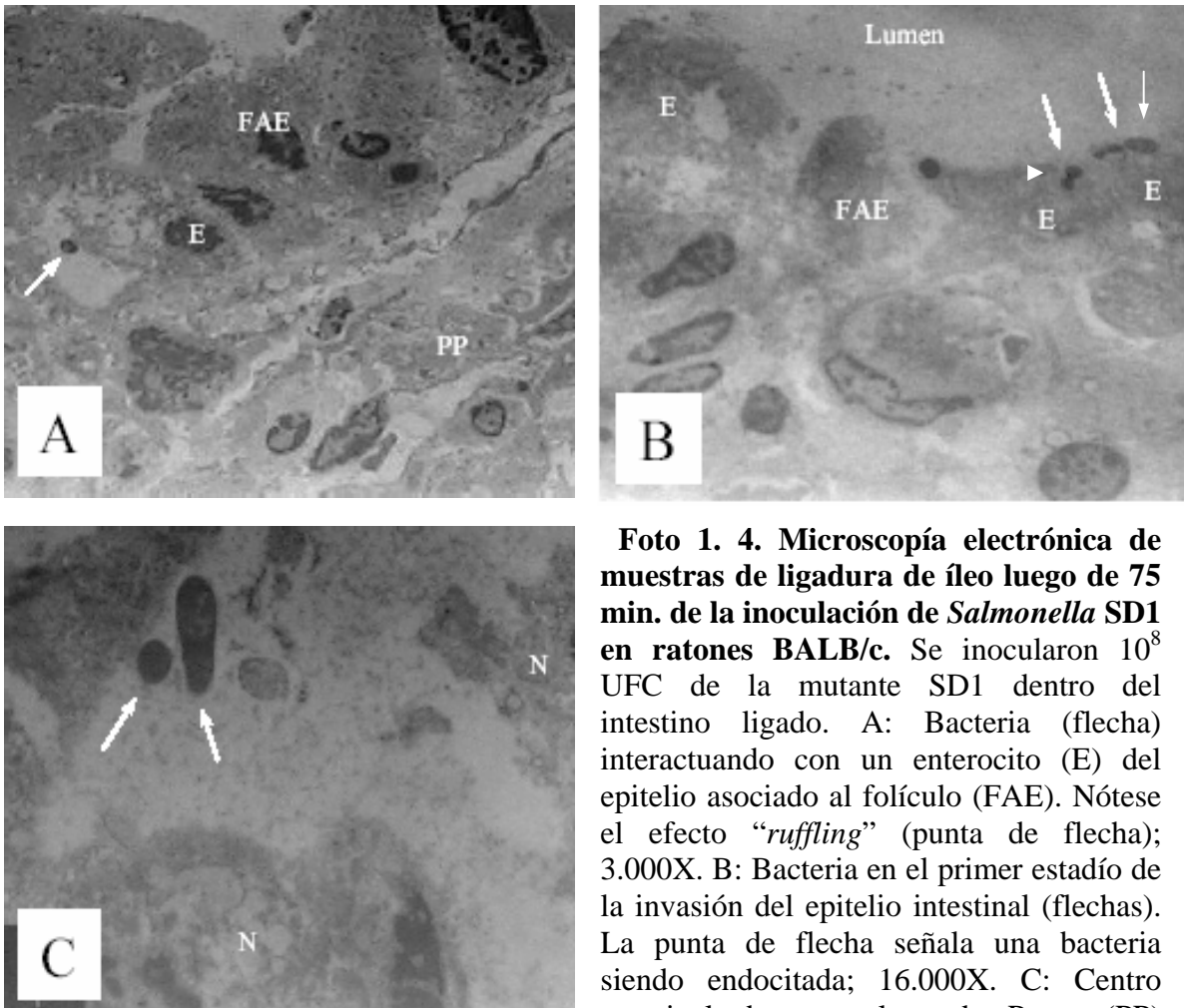
La cepa de *S. Enteritidis* que porta una proteína Dam ts (SD1) es significativamente más atenuada que la cepa virulenta, inoculada por cualquiera de las vías estudiadas. La atenuación encontrada para esta cepa es comparable con la descrita para la cepa de *S. Typhimurium* carente de Dam.

### 4. Interacción temprana de la mutante SD1 con la mucosa intestinal

Dado que la inocuidad de mutantes de *Salmonella* spp. carentes de proteína Dam se relaciona con su incapacidad de invadir la mucosa intestinal (García del Portillo F. y col., 1999), se decidió analizar la capacidad de invasión de la mutante SD1. Con este objetivo, se estudiaron los eventos tempranos que tienen lugar en el intestino luego de la inoculación de la cepa SD1. Se utilizó el modelo murino de ligadura de íleo descrito por Jones B.D. y col. (1992). A diversos tiempos post inoculación, se tomaron muestras para microscopía electrónica. Los resultados se muestran en la Foto 1. 4.

A diferencia de las mutantes *dam* de *S. Typhimurium*, la cepa SD1 fue capaz de interactuar tempranamente con el epitelio intestinal murino. La interacción directa de las

bacterias con el epitelio, a menudo se asoció con el efecto de festoneado (*ruffling*) de la superficie de la célula apical (Foto 1. 4 A). A los 75 min. luego de la inoculación, se encontraron bacterias tanto invadiendo células epiteliales (Foto 1. 4 B) como dentro de las placas de Peyer (Foto 1. 4 C).



**Foto 1. 4. Microscopía electrónica de muestras de ligadura de íleo luego de 75 min. de la inoculación de *Salmonella* SD1 en ratones BALB/c.** Se inocularon  $10^8$  UFC de la mutante SD1 dentro del intestino ligado. A: Bacteria (flecha) interactuando con un enterocito (E) del epitelio asociado al folículo (FAE). Nótese el efecto “*ruffling*” (punta de flecha); 3.000X. B: Bacteria en el primer estadio de la invasión del epitelio intestinal (flechas). La punta de flecha señala una bacteria siendo endocitada; 16.000X. C: Centro germinal de una placa de Peyer (PP)

conteniendo dos bacterias (flechas); 16.000X. FAE, Epitelio asociado al folículo; PP, placa de Peyer; N, núcleo; nec, necrobiosis; E, enterocito.

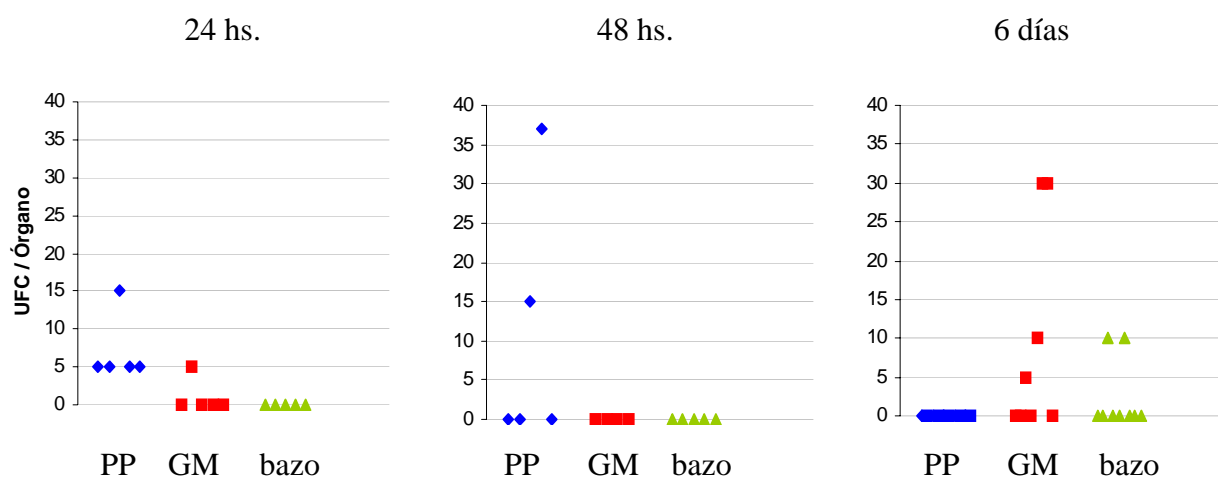
### Conclusión parcial

A diferencia de las mutantes que carecen de la proteína Dam, la cepa SD1 es capaz de inducir cambios tempranos en la mucosa intestinal. El efecto “*ruffling*” en los enterocitos generado por la mutante sugeriría que la misma cuenta con el sistema de

secreción de proteínas funcionante. La mutante SD1 es capaz de penetrar en el epitelio intestinal e invadir las placas de Peyer dentro de las primeras horas post inoculación.

## 5. Colonización y persistencia

Dada la capacidad invasiva de la mutante SD1, se decidió analizar la colonización de los órganos internos y la persistencia de la bacteria en los mismos, a diferentes tiempos post administración. La Fig. 1. 9 muestra la colonización y persistencia de la mutante SD1, en ratones BALB/c inoculados por la vía i.g. Un bajo número de bacterias se recuperó de los órganos internos luego de la administración de la mutante. A las 24 y 48 hs. las bacterias sólo se encontraron en placas de Peyer. Luego de 6 días, la mutante pudo ser recuperada de ganglio mesentérico y de bazo. Si bien la cantidad de bacteria encontrada en los órganos es baja, la mutante pudo aislarse de todos los órganos involucrados en la ruta de la infección natural.



**Figura 1. 9. Colonización y persistencia de la cepa SD1.** El gráfico muestra la cantidad de UFC recuperadas de placas de Peyer (PP), ganglio mesentérico (GM) y bazo luego de la administración de  $1-2 \times 10^9$  UFC / animal de la mutante SD1 por vía i.g.

## Conclusión parcial

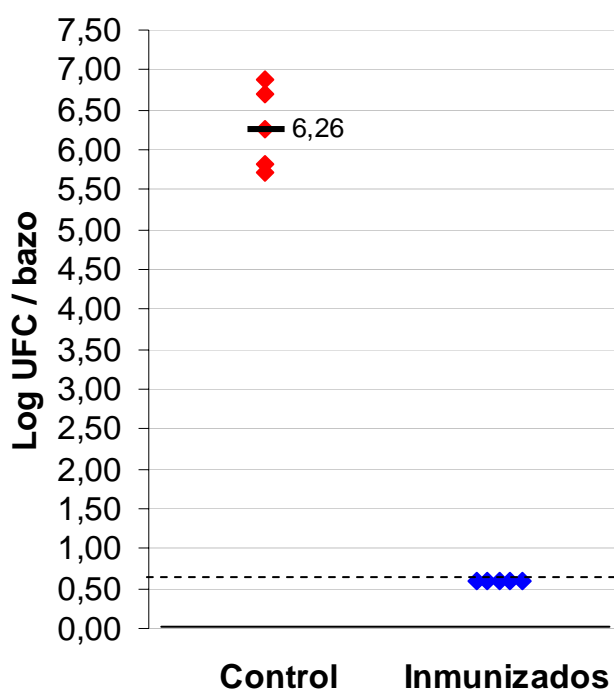
A diferencia de las mutantes de *Salmonella* que carecen de la proteína Dam, la mutante SD1 muestra capacidad de colonización de los órganos blanco luego de la inoculación por la vía intragástrica.

## 6. Capacidad protectora de la mutante SD1

Dada las características de inocuidad de la mutante SD1 y de su capacidad de interactuar con el epitelio intestinal, se diseñaron experimentos utilizando a la mutante como vacuna experimental viva de uso oral.

### 6.1. Determinación de la depuración esplénica

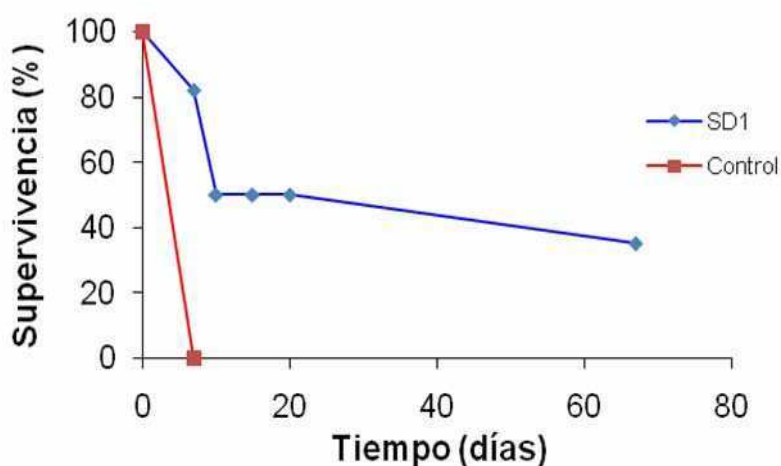
Se evaluó la capacidad de la cepa SD1 para inducir la depuración esplénica de la cepa virulenta de *S. Enteritidis* (La metodología se detalla en Materiales y Métodos de este Capítulo 1; punto 14). Los ratones recibieron 1 inoculación i.g. semanal, durante 3 semanas, con la cepa vacuna SD1. Veintiún días luego de la última inmunización los ratones se desafiaron con 12 DL<sub>50</sub> de la cepa salvaje, por vía oral. A los 5 días del desafío, los animales se sacrificaron y se determinó el número de UFC de la cepa salvaje en el bazo. En la Fig. 1. 10 se observa que los ratones inmunizados con la mutante SD1 depuran más eficientemente la cepa salvaje de *S. Enteritidis* comparados con los no inmunizados. Cinco días luego del desafío, la mediana del log UFC en el bazo de los animales controles fue significativamente mayor ( $p = 0,0159$ ) a la encontrada en el bazo de los animales inmunizados (6,26 vs. 0,6 respectivamente).



**Figura 1. 10. Depuración de la cepa salvaje del bazo de animales inmunizados con la cepa mutante SD1.** Los ratones se inmunizaron i.g. con la cepa mutante SD1 como se describe en Materiales y Métodos. Los animales se sacrificaron 5 días luego del desafío. La línea punteada representa el límite de detección (< 5 UFC / bazo). Los valores de las medianas fueron comparados usando el *test* de Mann - Whitney. Se encontró una diferencia significativa entre los ratones inmunizados y el grupo control ( $p = 0,0159$ ).

## 6.2. Determinación de la sobrevida al desafío con la cepa virulenta

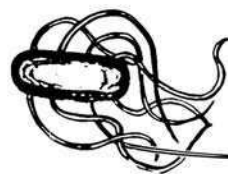
Se estudió aquí el grado de protección conferido por la mutante SD1 a los animales inmunizados y desafiados con la cepa virulenta de *S. Enteritidis*. Los animales fueron inoculados por vía intragástrica con una dosis semanal de la cepa SD1 (inóculo:  $2-5 \times 10^8$  UFC / animal) durante tres semanas. Veintiún días luego de la última inmunización los animales se desafiaron con  $4 \times 10^4$  UFC de la cepa virulenta ( $2 DL_{50}$ ). La sobrevida de los animales se registró diariamente durante 70 días. La Fig. 1. 11 muestra los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos realizados. Puede observarse que los animales controles (sin inmunizar) no sobrevivieron más allá de los 7 días post desafío, mientras que en ese mismo período el 80 % de los animales inmunizados sobrevivió. La tasa de sobrevida de los animales inmunizados descendió al 50 % al día 10 post desafío y se mantuvo durante varias semanas. Se observó que un pequeño número de animales inmunizados murió tardíamente; esto indica que, medida a lo largo de 70 días, la protección conferida por la cepa SD1 resultó del 40 %.



**Figura. 1. 11. Capacidad protectora de la mutante SD1 de *S. Enteritidis*.** Los ratones fueron inmunizados con tres dosis i.g. de  $2-5 \times 10^8$  UFC de la cepa SD1 de *S. Enteritidis*. Los animales fueron desafiados 21 días más tarde con  $4 \times 10^4$  UFC / animal ( $2 DL_{50}$ ) de la cepa virulenta. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## **Conclusiones parciales**

La inoculación de los animales con la cepa SD1 generó cierto grado de protección contra el desafío con la bacteria virulenta. Cuando se evaluó la depuración esplénica de la cepa salvaje, 5 días luego del desafío, se observaron diferencias significativas respecto de los animales controles. En cuanto a los experimentos de sobrevida, el 40% de los animales inmunizados y desafiados con 2 DL<sub>50</sub> sobrevivieron hasta el día 70 luego del desafío. Si comparamos estos valores con los descriptos para la cepa *dam* de *S. Typhimurium*, (80-100 % de protección de los animales desafiados con 160 DL<sub>50</sub>) podemos concluir que la mutante SD1 confiere una protección significativamente menor.



## *Discusión*

---

## Discusión

Uno de los objetivos de este trabajo fue obtener y caracterizar una mutante de *S. Enteritidis* con una proteína Dam ts. Esta cepa, denominada SD1, fue obtenida mediante la transducción de la inserción *dam-231::Tn10dTet* proveniente de la cepa D220 de *S. Typhimurium* a la cepa virulenta de *S. Enteritidis* #5694. De esta manera la cepa SD1, al igual que la cepa D220 (Brawer R, y col., 1998), porta una mutación en el gen *dam* cuya expresión genera una proteína carente de los últimos 10 aminoácidos. Como consecuencia se observó que la cepa SD1 presenta un fenotipo *dam* que se afecta con la temperatura. Los experimentos *in vitro* demostraron que la filamentación y la sensibilidad a 2-AMP (dos características de las mutantes *dam*) se incrementan a 37 °C, sugiriendo que la mutante SD1 posee una proteína Dam ts. La filamentación sería una desventaja para una potencial cepa vacuna. Algunos trabajos sugieren que la filamentación de la bacteria dentro de los macrófagos facilita la presentación antigénica (Martinez-Lorenzo M.J. y col., 2001). La reversión del patrón de metilación del ADN de la cepa SD1 y de la sensibilidad a 2-AMP cuando se complementó con el plásmido que porta el gen *dam* salvaje, indica que la mutante SD1 presenta una proteína Dam defectuosa.

Los experimentos *in vivo* demostraron que la mutante SD1 es altamente atenuada. Las DL<sub>50</sub> encontradas son similares a las descritas para las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* que carecen totalmente de la proteína (Heithoff D.M. y col., 2001; Mohler V.L. y col., 2006). Es muy probable que, al igual que lo que ocurre *in vitro*, la actividad Dam en la cepa SD1 se afecte con la temperatura corporal del ratón. Por lo tanto, la avirulencia de la mutante SD1, podría ser el resultado de múltiples defectos en procesos celulares que reducen su viabilidad. En experimentos adicionales (no mostrados) se observó que la cepa SD1 presenta una mayor sensibilidad a algunos componentes de la inmunidad innata. Al igual que otras mutantes *dam* (Prieto A.I. y col., 2004; Taylor V.L. y col., 2005), la mutante SD1 presentó una incrementada sensibilidad a detergentes como deoxicolato, a sales biliares y al peróxido de hidrógeno respecto de la cepa salvaje, que es intrínsecamente resistente a estos componentes (datos no mostrados). Un aumento en la sensibilidad al deoxicolato resulta en una menor llegada de la bacteria al intestino delgado y en consecuencia se incrementa la DL<sub>50</sub>.



Algunos autores asocian esta mayor sensibilidad a los detergentes a defectos en la estabilidad de la membrana (Pucciarelli M.G. y col., 2002). En resumen, la atenuación de la mutante SD1 podría deberse en parte a una mayor sensibilidad a algunos componentes de la inmunidad innata.

García del Portillo F. y col. (1999) demostraron que las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* presentan incapacidad para invadir el epitelio intestinal y causar citotoxicidad en las células M. De hecho, en estudios realizados utilizando la técnica de la ligadura de íleo, se encontró que las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* no generan una respuesta inflamatoria en el epitelio intestinal y son incapaces de invadir la mucosa (García del Portillo F. y col., 1999). Por el contrario, nuestros resultados demuestran que la mutante SD1 retiene su capacidad para interactuar con el epitelio intestinal y es capaz de generar una respuesta inflamatoria controlada en el intestino. Mediante microscopía electrónica se comprobó que la mutante induce el efecto *ruffling* en las células epiteliales y citotoxicidad en el epitelio intestinal luego de la inoculación en la ligadura de íleo. Este rearrreglo del citoesqueleto se produce en respuesta a las proteínas de invasión secretadas por *Salmonella* spp. y translocadas al citoplasma de la célula eucariota a través del sistema de secreción tipo tres 1 (SSTT-1) (Brumell J.H. y col., 1999; Gorvel J.P. y col., 2001; Santos R.L. y col., 2003). Así, la bacteria induce su propia endocitosis por la célula del epitelio intestinal. Más aún se encontró que la mutante SD1 es capaz de invadir la mucosa intestinal, de hecho se la ha localizado tempranamente dentro de las placas de Peyer a los 75 minutos de la inoculación. Estos hallazgos indicarían que la mutante SD1 posee el sistema de secreción de proteínas funcionante, al menos durante las primeras horas luego de la inoculación en los animales. Estas características son esenciales para que las bacterias puedan ser utilizadas como transportadoras de antígenos heterólogos (Panthel K. y col., 2005).

Las cepas virulentas de *S. Enteritidis* administradas a ratones por la ruta oral o intragástrica, proliferan en placas de Peyer, ganglios linfáticos, bazo y otros órganos internos y produce la muerte del animal en un término de 5-7 días (Gherardi M.M. y col., 1993a y 1993b). En el caso de la mutante SD1, si bien conservó la capacidad de invadir, fue recuperada en bajo número de los órganos internos. Este hecho concuerda con el importante nivel de atenuación de la mutante. La limitada colonización de los órganos podría deberse a una suma de factores. Por un lado la sensibilidad a componentes de la inmunidad innata -discutida más arriba- limitaría el número de

bacterias que alcanza el epitelio intestinal. Se sumaría además el efecto inhibitorio de la temperatura sobre el crecimiento de la mutante. Cabe recordar que los estudios in vitro demostraron que la tasa de crecimiento de la mutante es menor a 37 °C que a 28 °C.

Algunos investigadores sostienen que la eficacia de una vacuna viva está determinada por su habilidad para persistir en los tejidos (Fahey K.J. y R.G.N. Cooper, 1977). Esta hipótesis, sin embargo ha sido discutida en profundidad (O'callagan D. y col., 1998; Sigwart D.F. y col., 1989). Se encontró que a pesar de la escasa colonización, la cepa SD1 es capaz de generar inmunidad protectora en el modelo murino. Los animales inmunizados presentan una excelente depuración de la cepa virulenta de *S. Enteritidis* del bazo. Existen ciertas ventajas en las cepas vacunas que generan protección con una limitada persistencia en los tejidos, ya que una larga sobrevida en el tejido del huésped podría ser adversa y no estaría garantizada su completa depuración. Otra ventaja de las cepas vacuna que persisten en forma limitada es que pueden ser administradas en dosis altas.

Un tema discutido, en lo que refiere a las características que deberían presentar las cepas vacuna vivas de *Salmonella* spp., es su capacidad de invasión. Por un lado, resulta claro que la falta de invasividad, como sucede en las mutantes *dam* descritas hasta el momento, contribuye a su elevada atenuación. No obstante, algunos estudios realizados con cepas atenuadas de *S. Enteritidis*, demostraron que a mayor capacidad de invadir mayor es la respuesta inmune (Darji A. y col., 2000). El fenotipo termosensible de la proteína Dam, le permite a la cepa SD1, invadir los tejidos y permanecer en ellos en forma limitada. Además, una mutante *dam* termosensible podría ser utilizada como una cepa transportadora de antígenos heterólogos.

En resumen, la delección de los últimos 10 aminoácidos origina una proteína de fenotipo termosensible en *S. Enteritidis*. La mutante SD1, a diferencia de las mutantes carentes de la proteína Dam de *S. Typhimurium*, es capaz de interactuar con la mucosa intestinal e inducir inmunidad. A pesar de que la mutante SD1 invade las placas de Peyer en forma temprana luego de la infección, es altamente atenuada.

Sin embargo, el análisis de la sobrevida de los animales inmunizados con la mutante SD1 y desafiados con dosis bajas (2 DL<sub>50</sub>) de la cepa virulenta, reveló que la protección conferida por la cepa mutante SD1 es significativamente menor que la descrita para las mutantes de *S. Typhimurium* carentes de Dam.

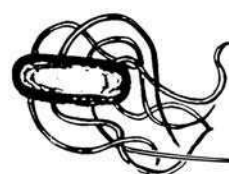


*Conclusiones*

## Conclusiones

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos concluir que la portación de una proteína Dam<sup>ts</sup> genera una cepa de *S. Enteritidis* atenuada respecto de la cepa parental, pero capaz de interactuar con la mucosa intestinal y de colonizar en forma limitada las placas de Peyer y el bazo. Esta es una diferencia sustancial respecto de las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* y permitiría el uso de cepas portadoras de proteína Dam<sup>ts</sup> como cepas vacuna-vector. Es de destacar, sin embargo, la diferencia en el grado de protección que confiere la mutante SD1 portadora de una proteína Dam<sup>ts</sup>, comparado con lo descrito para las mutantes *S. Typhimurium* carentes de Dam.

**Estos hechos** nos permiten plantear aquí **nuevos interrogantes**: ¿es posible que las diferencias observadas entre estas dos mutantes se deban al fenotipo termosensible de la proteína Dam? ¿o se trata de una diferencia relacionada con la serovariedad en que se generó? (Estos hechos e interrogantes dieron origen al Capítulo 2).



***Materiales y  
Métodos***

---

# Materiales y Métodos

## 1. Bacterias y cultivos bacterianos

Las características más relevantes de las bacterias utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 1. 2. La mutante *dam* de *S. Enteritidis*, llamada SD1, se obtuvo mediante una técnica de transducción utilizando el bacteriófago P22HT descrita más adelante. De este modo, se transfirió la inserción *dam-231::Tn10dTet* de la cepa D220 de *S. Typhimurium* a la cepa virulenta de *S. Enteritidis* #5694. Se utilizaron placas de agar de soja tripticase (TSA, Lab. Difco) para la propagación de las bacterias. En el caso de cepas termosensibles la propagación se realizó mediante la técnica de réplica en placa en dos placas de TSA incubadas a 28 °C y 37 °C para control de termosensibilidad. Se comenzó la siembra por agotamiento en estría en la placa a ser cultivada a 37 °C y con la misma ansa y sin tomar más muestra ni esterilizarla, se realizó una estriación en un extremo de otra placa que se incubaba a 28 °C. Luego con el ansa esterilizada se estrió de manera de interceptar la línea previamente hecha de forma que haya aislamiento en la placa. Las mutantes termosensibles muestran afectado su crecimiento a 37 °C y no a 28 °C. Los cultivos en medio líquido se realizaron inoculando 10 ml de caldo de soja tripticase (TSB) con dos o tres colonias, provenientes de placas incubadas 18 hs. La incubación se realizó en un agitador de aire a 200 r.p.m. a la temperatura correspondiente. Las temperaturas de incubación fueron de 28 °C ó 37 °C según la cepa y el experimento. En todos los casos, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml se determinó mediante siembra de diluciones apropiadas en placas de TSA.

**Tabla 1. 2. Características de las cepas bacterianas utilizadas en los experimentos**

Cepa	Fenotipo	Genotipo	DL <sub>50</sub> <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> D220	Dam ts <sup>b</sup>	<i>dam-231::Tn10dTet</i>	> 1 x 10 <sup>10</sup> UFC / ratón
<i>S. Typhimurium</i> TT11694	Dam	LT2 <i>dam-10d::MuJ</i>	ND <sup>c</sup>
<i>S. Enteritidis</i> #5694	Salvaje	Salvaje	2 x 10 <sup>4</sup> UFC / ratón

<sup>a</sup> Dosis letal 50 % luego de la administración oral descrita en "Determinación de la DL<sub>50</sub>".

<sup>b</sup> Dam ts: Proteína Dam termosensible.

<sup>c</sup>ND: No determinada

## **2. Animales**

Para todos los estudios se utilizaron ratones Balb/c de 6-7 semanas de vida obtenidos del INTA los cuales se mantuvieron en condiciones estándar definidas por la *Guide for the care and use of laboratory animals* (DEW, Publication No. 78-23, NIH)

## **3. Técnica de transducción**

La técnica de transducción se realizó basándose en el método de Sambrook J. y col. (1989).

### **3.1. Condiciones de crecimiento del bacteriófago en la cepa bacteriana donante**

Para la propagación del fago P22HT se realizó un cultivo de la cepa bacteriana donante termosensible D220 en 5 ml de caldo TSB a 28 °C en agitación durante 18 hs. Para obtener una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,01, 1 ml del cultivo de 18 hs. (aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC / ml) fue adicionado a 4 ml de caldo P22 (cada 20 ml: LB, 15 ml; Sales E, 5 ml; Glucosa 40 %, 0,1 ml; CaCl<sub>2</sub> 1M, 0,05 ml) y 0,1 ml del fago P22HT [aproximadamente  $10^{10}$  unidades formadoras de placas (UFP)]. Los 5,1 ml finales se incubaron durante 24 hs. en agitación a 28 °C, luego se realizó una centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 5 min., se descartó el *pellet* obtenido y el sobrenadante se transvasó a un tubo. Luego se filtró mediante un filtro MILLIPORE de 0,45 µm y se conservó a 4 °C.

### **3.2. Ensayo de placa para la titulación de los lisados transductores**

La determinación del título de los lisados transductores obtenidos según la metodología descrita en el punto anterior, se realizó mediante un ensayo de placa. Para ello se realizó un cultivo de la cepa parental *S. Enteritidis* #5694, en medio LB con CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM a 37 °C en agitación, a partir de un cultivo de 18 hs. de incubación crecido en LB. El cultivo se incubó hasta una DO correspondiente a  $2 \times 10^8$  UFC / ml. Por otro lado se realizaron diluciones seriadas al décimo de los lisados. Dichas diluciones se llevaron a cabo con caldo P22. En dos tubos de ensayo se mezclaron 0,3 ml del cultivo bacteriano con 0,1 ml de cada dilución del lisado. La mezcla de fago y bacteria se incubó en estufa a 37 °C durante 15 min. para permitir la adsorción del fago a la bacteria. Como control

se incluyó un tubo conteniendo solamente 0,3 ml de cultivo bacteriano. Luego se agregaron 3 ml de agar LB al 0,5 % fundido a cada uno de los tubos y se volcó sobre una placa con una base de agar LB + CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM. La incubación de las placas se realizó en estufa a 37 °C y el recuento de las UFP se realizó luego de las 18 hs. de incubación.

### **3.3. Ensayo de transducción**

Se realizó un cultivo de la cepa receptora *S. Enteritidis* #5694 de la misma forma a la descrita en el punto anterior. En un tubo de ensayo (tubo experimental) se colocaron 0,3 ml del cultivo bacteriano y 0,3 ml del lisado titulado. En otro tubo (control de bacteria) se colocaron 0,3 ml del cultivo bacteriano y 0,3 ml de medio de cultivo P22 y en un tercer tubo (control del fago P22) se colocaron 0,3 ml del lisado y 0,3 ml de medio de cultivo P22. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 15 min. en estufa para permitir la adsorción del fago a la bacteria y el pasaje del ADN (transducción). Luego, para quelar el Ca<sup>2+</sup> y detener así la unión del fago a la bacteria, se añadió ácido etilén glicol tetra acético (EGTA) 0,5 M y se incubó entre 2-3 hs. en estufa a 28 °C permitiendo que crezcan las transductantes.

### **3.4. Selección de la cepa termosensible *dam* de *S. Enteritidis* #5694, SD1**

Dado que el transposón mini Tn10 contenido en el fragmento de interés confiere resistencia a tetraciclina (Tet), la selección de las cepas transductantes se realizó en medio selectivo TSA conteniendo este antibiótico (2 mg Tet / ml TSA). Se sembraron por separado, 0,2 ml de ambos tubos controles del ensayo de transducción y diferentes diluciones del tubo experimental en placas con Tet. La incubación de las placas se realizó a 28 °C ya que se buscaba una mutante con el mismo fenotipo termosensible que posee la mutante *dam* D220. Por último se procedió a la selección de la cepa de interés mediante la técnica de réplica en placa. Las mutantes *dam* son sensibles a 2-aminopurina (2-AMP) (Palmer B.R. y Marinus M.G., 1994) pudiéndose determinar la sensibilidad a este análogo de base usando placas de TSA que contienen 100 µg de 2-AMP / ml. Por lo tanto las colonias aparecidas en las placas de Tet se repicaron en réplica en placa de 2-AMP, Tet y TSA incubadas a 28 y 37 °C. Como control se repicaron en las mismas placas la cepa salvaje de *S. Enteritidis* y la cepa mutante D220.



Una vez seleccionada, la cepa se conservó a -20 °C para su posterior análisis y caracterización.

#### **4. Extracción plasmídica**

Para la extracción del plásmido pIZ833, portador del gen *dam* salvaje, se utilizó el *Kit* QIAGEN QIA prep. Con este objetivo, la cepa portadora del plásmido pIZ833 (DH5- $\alpha$  / pIZ833) se cultivó en caldo LB suplementado con Amp durante 18 hs. con agitación a 37 °C. Se realizó una extracción según lo indicado por el fabricante del *kit*. Para confirmar la presencia del mismo, se sembraron 4  $\mu$ l del producto de extracción en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio, junto con un marcador de peso molecular (1 kb *DNA ladder*, Promega) y se visualizó bajo luz UV. Posteriormente, el producto de la extracción plasmídica se conservó a 4 °C hasta el momento de su utilización.

#### **5. Técnicas de transformación por electroporación**

##### **5.1. Obtención de células electrocompetentes**

Se realizó un cultivo de la cepa receptora en 10 ml de caldo LB con agitación por 18 hs. Se tomaron 500  $\mu$ l del precultivo y se lo incubó con 10 ml de medio LB durante 1 h bajo agitación a 37 °C. Se centrifugó a 7.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos, previo enfriamiento en hielo durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet*, fracción con bacterias, se resuspendió en 10 ml de agua miliQ. Luego se repitió la centrifugación y se resuspendió el *pellet* en 150  $\mu$ l de glicerol al 10 %. Se conservó la muestra a -80 °C.

##### **5.2. Ensayo de electroporación**

Los ensayos de transformación se realizaron tomando 40  $\mu$ l de células electrocompetentes los cuales se incubaron con 7  $\mu$ l (630 ng) de plásmido pIZ833 durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, esta mezcla se colocó en cubetas previamente enfriadas y se procedió a la electroporación en las siguientes condiciones: resistencia 200 ohms ( $\Omega$ ), capacitancia 2,5 faraday (F) y resistencia 1,25 kvolts (kv). Luego de la electroporación, las bacterias se recuperaron durante 3 hs a 37 °C con 800  $\mu$ l de medio SOC. Por último se sembraron 100 y 700  $\mu$ l en placas de agar TSA con

Amp, de modo de seleccionar positivamente a las células que fueron transformadas con el plásmido pIZ833.

## **6. Conservación de cepas**

La conservación de la cepa obtenida se realizó tomando un hisopado proveniente de una placa fresca y resuspendiendo el inóculo en crioviales conteniendo 1,5 ml de una mezcla en partes iguales de dimetilsulfóxido (DMSO) al 14 % y caldo soja tripticase doble concentrado (TSB 2X). Los viales de esta forma preparados, se conservan a -20 °C durante largos períodos.

## **7. Estudio de crecimiento de la mutante SD1 en medio sólido una vez aislada**

Primero las mutantes se seleccionaron por su crecimiento diferencial a las dos temperaturas utilizando medios con Tet y 2-AMP (réplica en placa). El siguiente paso fue el aislamiento de las mismas. Para realizar dichos aislamientos se repicó la mutante SD1 de la estría crecida en la placa con Tet incubada a 28 °C de la réplica en placa. Se realizaron cultivos en forma de réplica en placas con 2-AMP, Tet y TSA incubadas a 28 °C y en 2 placas con Tet incubadas a las distintas temperaturas junto con otra placa de TSA incubada a 28 °C de manera tal de obtener colonias aisladas. Se sembró por agotamiento en estría en la placa a ser cultivada a 37 °C y con la misma ansa y sin esterilizarla, se realizó una estriación en un extremo de la placa a ser incubada a 28 °C. Luego con el ansa esterilizada se estrió interceptando la línea previamente hecha de manera que haya aislamiento en la placa.

## **8. Microscopía**

Las cepas bacterianas se analizaron microscópicamente tanto en fresco (sin teñir) como luego de la tinción de Gram (Britania). Se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss standard 25. Las imágenes se captaron mediante una cámara fotográfica MC80.

## **9. Curvas de crecimiento bacteriano**

Se realizaron estudios básicos para establecer las condiciones de cultivo de la cepa SD1. Para ello se cultivaron las bacterias en 10 ml de TSB registrando a distintos tiempos la absorbancia a 600 nm mediante un espectrofotómetro. Para cada DO se tomaron

muestras de 0,1 ml del cultivo, se realizaron las diluciones correspondientes y se sembraron en placas de TSA. Luego de 24 hs. de incubación de las placas se procedió a realizar el recuento de las UFC. El crecimiento bacteriano se graficó en curvas de densidad óptica (DO) vs. tiempo (t) y curvas de UFC / ml vs. t. Luego se realizó una correlación directa entre UFC y DO. En base a las curvas de crecimiento se obtuvieron los cultivos a la densidad bacteriana deseada.

## **10. Estado de metilación del ADN de la mutante *dam***

Se estudió el estado de metilación de las cepas salvaje, SD1 y SD1 / pTP166 mediante digestión diferencial con enzimas de restricción. Como control, se incluyó la mutante TT11694 que carece totalmente de la proteína Dam. Se extrajo el ADN genómico total de dichas cepas utilizando un *kit* de purificación de ADN (*Wizard genomic DNA purification kit* Promega Madison, USA). El ADN total fue tratado con tres enzimas de restricción: *Sau3AI*, *MboI* y *DpnI*, que digieren ADN metilado, no metilado y ambos, metilado y no metilado, respectivamente. La mezcla de reacción consistió en 2 µl de ADN (0,5 µg), 2 µl del *buffer* de incubación correspondiente para cada enzima, 2 µl de la enzima (2 unidades / µg de enzima) y 14 µl de agua bidestilada estéril. Dicha mezcla se incubó durante 2 hs. a 37 °C y la reacción se detuvo con 0,5 M de EDTA a -20 °C.

El producto de los tratamientos enzimáticos se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5 % en TAE teñido con Bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

## **11. Determinación de la dosis letal 50**

El cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) se realizó basándose en el método de Reed L.J. y H. Muench (1938). Cada cepa se cultivó en 10 ml de caldo TSB hasta alcanzar una DO equivalente a  $1 \times 10^9$  UFC / ml. El cultivo se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 min. a 4 °C, luego el *pellet* se resuspendió en 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> 3 %. Se realizaron las correspondientes diluciones 1:10 para obtener diferentes dosis con distintas densidades bacterianas. Grupos de 5 animales, privados de agua y comida durante 3 hs., se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.), vía oral (v.o.) ó por vía intragástrica (i.g.) con 0,2, 0,3 y 0,5 ml respectivamente, de la resuspensión bacteriana. La tasa de mortalidad se registró diariamente durante un período de 30 días.

## **12. Estudio de colonización y persistencia**

La capacidad para invadir y persistir en la mucosa intestinal y alcanzar órganos internos como placas de Peyer (PP), bazo y ganglio mesentérico (GM) se analizó para la cepa vacuna SD1. Para ello, los ratones fueron inoculados por vía i.g. con  $1-2 \times 10^9$  UFC / animales de bacteria en estudio. La inoculación se realizó introduciendo 0,5 ml de la suspensión bacteriana en el esófago mediante una aguja 21G con extremo romo dispuesta en una jeringa plástica de 1 ml (Gherardi M.M. y col., 1993a, 1993b y 2000). Los ratones fueron privados de agua y comida 6 hs. antes de la inmunización. Treinta minutos antes de la inmunización, se les administró 30  $\mu$ l de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 10 % a fin de aumentar el pH gástrico. Tres grupos de 5 animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 y 48 hs. y a los 6 días luego de la inoculación i.g. El bazo, las PP y el GM se homogenizaron en 1, 0,5 y 0,5 ml de solución fisiológica (SF) respectivamente utilizando un homogenizador de tejidos ULTRA TURRAX<sup>®</sup> T25 basic. Los homogenatos se diluyeron apropiadamente en SF y se sembraron alícuotas de 0,1 ml en agar TSA y Levine incubadas a 28 °C. Las colonias con apariencia de *Salmonella* spp. que crecieron en las placas de agar se cultivaron en picos de flauta de Triple Azúcar Hierro (TSI) y fueron analizadas con respecto a la termosensibilidad en forma de réplica en placa en placas con Tet. Aquellas colonias que presentaron un TSI compatible con *Salmonella* spp. se sembraron en tubos con agar Buenos Aires modificado (BAM). El BAM permite detectar ureasa y por lo tanto diferenciar *Salmonella* spp. (ureasa negativa) de *Proteus* spp. (ureasa positiva).

## **13. Estudio de interacción temprana de la mutante SD1 con la mucosa intestinal**

Se utilizó el modelo descrito por Jones B.D. y col. (1992 y 1994) para estudiar la interacción temprana de las cepas de *S. Enteritidis* salvaje y SD1 con el epitelio intestinal murino. Los ratones se anestesiaron vía i.p. con una inyección de uretano (0,12 g uretano / 100 g de ratón). Se realizó una pequeña incisión en el abdomen para exponer el íleo (última porción del intestino delgado). Se procedió a ligar con hilo ambos extremos de una porción de 4 a 5 cm conteniendo al menos una PP. Dentro de esta porción ligada se inocularon 200  $\mu$ l de un cultivo de  $5 \times 10^8$  UFC / ml de la cepa salvaje o de la cepa SD1 mediante una aguja hipodérmica. Luego se retornó el intestino al abdomen y se procedió a suturar la incisión. Los animales, mantenidos vivos bajo

anestesia, se sacrificaron posteriormente a diferentes tiempos por dislocación cervical y las ligaduras de fleo se extrajeron para su posterior procesamiento. Las muestras fueron fijadas por inmersión durante toda la noche a 4 °C en una solución de glutaraldehído al 5 % y de paraformaldehído al 4 % en un *buffer* de cacodylato de sodio 0,1 M. Posteriormente los tejidos se lavaron 3 veces con *buffer* de cacodylato de sodio 0,1 M y se fijaron durante 2 horas a 4 °C en tetróxido de osmio al 1 % en *buffer* de cacodylato de sodio 0,1 M. Las muestras fueron teñidas durante toda la noche a 4 °C en una solución saturada de acetato de uranilo. Luego, los tejidos se deshidrataron en una serie de soluciones graduadas de etanol y óxido de propileno y se embebieron en Araldita Epon. Cortes de (0,5 µm) se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron bajo microscopía óptica para seleccionar los campos para microscopía electrónica. Los tacos se cortaron en secciones delgadas de 60–90 nm, se montaron sobre grillas de cobre y se colorearon con acetato de uranilo. Finalmente, se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 10C (García del Portillo F. y col., 1999).

#### **14. Estudios de depuración esplénica**

Como parámetro de protección se estudió la capacidad de ratones inmunizados con la mutante SD1 para eliminar la bacteria patógena del bazo. Cinco animales se inmunizaron vía i.g. con la cepa vacuna SD1 como se detalló en el punto de colonización y persistencia. El esquema de inmunización consistió en tres inoculaciones de aproximadamente  $6 \times 10^9$  UFC / animal de la cepa vacuna SD1 separadas por intervalos de siete días. Luego de 21 días a partir de la última inmunización se desafiaron los ratones con la cepa salvaje. El desafío se realizó inoculando 30 µl de la cepa virulenta por v.o.. La dosis desafío utilizada correspondió a 12 DL<sub>50</sub> de la cepa virulenta *S. Enteritidis* ( $2,5 \times 10^5$  UFC / ratón). Como control, grupos de 5 animales sin inmunizar se desafiaron con la cepa virulenta con la misma dosis que el grupo experimental. A los 5 días del desafío, los animales se sacrificaron y se removió el bazo de cada animal procesándolo como se detalló anteriormente en el punto de colonización y persistencia. Los homogenatos se diluyeron apropiadamente en SF y se sembraron alícuotas de 0,1 ml en agar *Salmonella-Shigella* (ss) y TSA incubándolas a 37 °C. Las colonias con apariencia de *Salmonella* spp. que aparecieron en las placas de agar SS se cultivaron al igual que se describió en el punto anterior en picos de flauta de TSI. Se analizó también la presencia de antígeno somático mediante la reacción de aglutinación

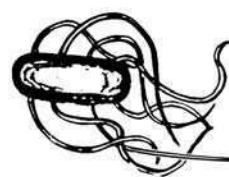
con el antisuero específico. En este caso se utilizó el antisuero anti-factor 9. El número de UFC recuperadas de los bazos de los animales inmunizados, identificadas como *Salmonella* spp., se comparó con aquel obtenido de los animales controles sin inmunizar (Gherardi M.M. y col., 1995).

## **15. Estudios de protección (sobrevida luego del desafío)**

Se estudió la capacidad protectora de la mutante SD1 mediante el registro de supervivencia de ratones inmunizados con la cepa vacuna SD1 y desafiados con la cepa virulenta de *S. Enteritidis*. Los animales se inmunizaron vía i.g. con la cepa vacuna SD1 como se detalló en el punto de colonización y persistencia. El esquema de inmunización utilizado es el mismo que se describe en el punto de depuración. Las tres inoculaciones con la cepa vacuna SD1 fueron de  $2-5 \times 10^8$  UFC / animal. Luego de 21 días a partir de la última inmunización, se desafiaron los ratones con la cepa salvaje. La dosis desafío utilizada correspondió a 2 DL<sub>50</sub> de la cepa virulenta de *S. Enteritidis* #5694 ( $4 \times 10^4$  UFC / ratón). Como control, grupos de 5 animales sin inmunizar se desafiaron con la cepa virulenta con la misma dosis que el grupo experimental. A lo largo de 70 días, se registró diariamente la supervivencia de los ratones inmunizados y desafiados.

## **16. Estadística**

Las medianas se compararon utilizando el *test* de Mann Whithney para muestras no apareadas.



*Referencias  
Bibliográficas*

---

## Referencias bibliográficas

- Barras, F. y M. G. Marinus.** 1989. The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. *Trends Genet.* **5**:139-143.
- Bolker, M. y R. Kahmann.** 1989. The *Escherichia coli* regulatory protein OxyR discriminates between methylated and unmethylated states of the phage Mu *mom* promoter. *EMBO J.* **8**:2403-2410.
- Boye, E. y A. Løbner-Olesen.** 1990. The role of *dam* methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **62**:981-989.
- Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, y D. A. Low.** 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **6**:577-588.
- Braden, C. R.** 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis.* **43**(4):512-7.
- Brawer, R., F. D. Batista, O. R. Burrone, D. O. Sordelli y M. C. Cerquetti.** 1998. A Temperature-Sensitive DNA Adenine Methyltransferase Mutant Of *Salmonella typhimurium*. *Arch Microbiol.* **169**(6):530-3.
- Brooks, J. E., R. M. Blumenthal y T. R. Gingeras.** 1983. The isolation and characterization of the *Escherichia coli* DNA adenine methylase (*dam*) gene. *Nucleic Acids Res.* Feb 11; **11**(3):837-51.
- Brumell, J. H., O. Steele-Mortimer y B. B. Finlay.** 1999. Bacterial invasion: Force feeding by *Salmonella*. *Curr. Biol.* **9**:R277-R280.
- Campbell, J. L. y N. Kleckner.** 1990. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from Dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* **62**:967-979.
- Casadesús, J. y J. Torreblanca.** 1996. Methylation-related epigenetic signals in bacterial DNA. In *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, pp. 141-153.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2008. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food--10 states, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **57**(14):366-70.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2008. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections caused by contaminated dry dog food--United States, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **57**(19):521-4.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2009. Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with peanut butter and peanut butter-containing products--United States, 2008-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **58**(4):85-90.
- Cerquetti, M. C., N. B. Goren, A. J. Ropolo, D. Grasso, M.N. Giacomodonato y M. I. Vaccaro.** 2002. Nitric oxide and apoptosis induced in Peyer's patches by attenuated strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun.* **70**(2):964-9.
- Cerquetti, M. C. y M. M. Gherardi.** 2000(a). Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis*. *Vaccine.* **18**(11-12):1140-5.
- Cerquetti, M. C. y M. M. Gherardi.** 2000(b). Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol.* **25**; **76**(2):185-92.



- Chambers, H. F., S. J. McPhee, M. A. Papadakis y L. M. Tierney, eds.** 2008. Current Medical Diagnosis & Treatment. 47th ed. McGraw-Hill Co; 1250-1252.
- Chamekh, M.** 2009. Immunomodulation using genetically engineered bacteria for type III-mediated delivery of heterologous antigens and cytokines: Potential application in vaccine and therapeutical developments. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* Sep 24.. [Epub ahead of print]
- Darji, A., S. zur Lage, A. I. Garbe, T. Chakraborty y S. Weiss.** 2000. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **27**:341-9.
- Dueger, E. L, J. K. House, D. M. Heithoff y M. J. Mahan.** 2001. *Salmonella* DNA Adenine Methylase Mutants Elicit Protective Immune Responses To Homologous And Heterologous Serovars In Chickens. *Infect Immun.* **69(12)**:7950-4.
- Fahey, K. J. y R. G. N. Cooper.** 1977. Oral immunization in experimental salmonellosis. *Infect. Immun.* **20**:183-191.
- Galen, J. E., M. F. Pasetti, S. Tennant, P. Ruiz-Olvera, M. B. Sztein y M. M. Levine.** 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunology and Cell Biology.* **87**, 400–412.
- García-Del Portillo, F., M. G. Pucciarelli, y J. Casadesús.** 1999. DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella typhimurium* Show Defects In Protein Secretion, Cell Invasion, And M Cell Cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **96**:11578-11583.
- Gherardi, M. M., M. I. Gómez, V. E. García, D. O. Sordelli y M. C. Cerquetti.** 2000. *Salmonella enteritidis* Temperature-Sensitive Mutants Protect Mice Against Challenge With Virulent *Salmonella* Strains Of Different Serotypes” *FEMS Immunol. and Med Microbiol.* **29**:81-88.
- Gherardi, M. M., D. O. Sordelli y Cerquetti M. C.** 1995. Relevance Of Local And Systemic Humoral Immunity To The Efficacy Of Immunization With Live-Attenuated *Salmonella enteritidis*. *Vaccine Res,* **4 (1)**:19-27.
- Gherardi M. M., V. E. García, D. O. Sordelli y M. C. Cerquetti.** 1993a. Protective Capacity Of A Temperature-Sensitive Mutant Of *Salmonella enteritidis* After Oral And Intra-gastric Inoculation In A Murine Model. *Vaccine,* **11(1)**:19-24.
- Gherardi M. M., V. E. García, V. Brizzio, D. O. Sordelli y M. C. Cerquetti.** 1993b. Differential Persistence, Immunogenicity And Protective Capacity Of Temperature-Sensitive Mutants Of *Salmonella enteritidis* After Oral Or Intra-gastric Administration To Mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **7**: 161-168.
- Gorvel, J. P. y S. Méresse.** 2001. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes and Infection,* **3**:1299-1303.
- Grassl, G.A.y B.B. Finlay.** 2008. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroenterol.* **24(1)**:22-6.
- Hattman, S., J. E. Brooks y M. Masurekar.** 1978. Sequence specification of the P1 modification methylase (M.Eco P1) and the DNA methylase (M.Eco dam) controlled by the *Escherichia coli dam* gene. *J Mol Biol* **126**:367-380.
- Heithoff D. M., E. Y. Enioutina, R. A. Daynes, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, y M. J. Mahan.** 2001. *Salmonella* DNA Adenine Methylase Mutants Confer Cross-Protective Immunity. *Infect and Immun.* **69(11)**:6725–6730.
- Jain, S. K.** 2009 . M-01ZH09, an oral live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine for the prevention of typhoid fever. *Curr Opin Mol Ther.* **11**:565-71.

- Jones, B. D., N. Ghori y S. Falkow.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med.* **180**:15-23.
- Jones, B. D., C. A. Lee y S. Falkow.** 1992. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect. Immun.* **60**: 2475.
- Jones, T. F., L. A. Ingram, K. E. Fullerton, R. Marcus, B. J. Anderson, P. V. McCarthy, D. Vugia, B. Shiferaw, N. Haubert, S. Wedel y F. J. Angulo.** 2006. A case-control study of the epidemiology of sporadic *Salmonella* infection in infants. *Pediatrics.* **118**(6):2380-7.
- Kahng, L. S. y L. Shapiro.** 2001. The CcrM DNA methyltransferase of *Agrobacterium tumefaciens* is essential, and its activity is cell cycle regulated. *J. Bacteriol.* **183**:3065-3075.
- Lacks, S. y B. Greenberg.** 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* **114**:153-168.
- Linam, W. M. y M. A. Gerber.** 2007. Changing epidemiology and prevention of *Salmonella* infections. *Pediatr Infect Dis J.* **26**(8):747-8.
- Løbner-Olesen, A., O. Skovgaard, y M. G. Marinus.** 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:154-160.
- Low, D. A., N. J. Weyand y M. J. Mahan.** 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun.* **69**(12): 7197–7204.
- Lyngstadaas, A., A. Lobner-Olesen y E. Boye.** 1995. Characterization of three genes in the dam-containing operon of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **247**(5):546-54.
- Mahan, M. J., y D. A. Low.** 2001. DNA methylation regulates bacterial gene expression and virulence. *ASM News.* **67**:1-7. 356-361.
- Marinus, M. G.** 1996. Methylation of DNA, p. 782-791. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Martinez-Lorenzo, M. J., S. Meresse, C. de Chastellier, y J. P. Gorvel.** 2001. Unusual intracellular trafficking of *Salmonella typhimurium* in human melanoma cells. *Cell Microbiol.* **3**:407-16.
- Mohler, V. L., D. M. Heithoff, M. J. Mahan, K. H. Walker, M. A. Hornitzky, C. S. McConnell, L. W. Shum y J. K. House.** 2006. Cross-protective immunity in calves conferred by a DNA adenine methylase deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Vaccine.* **27**;24(9):1339-45.
- Nicholson, B. y D. Low.** 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **35**:728-742.
- O'callagan, D., D. Maskell, F. Y. Liew, C. S. F. Easmon, y G. Dougan.** 1998. Characterization of aromatic and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence and ability to induce protective immunity in BALB mice. *Infect. Immun.* **56**: 419-423.
- Palmer, B. R. y M. G. Marinus.** 1994. The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene.* **143**(1):1-12.
- Pantel, K., K. M. Meinel, V. E. Domènech, H. Retzbach, E. I. Igwe, W. D. Hardt y H. Rüssmann.** 2005. *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. *Infect. Immun.* **73**(1):334-41.

- Peques, D. A., M. Ohl, S. Miller, Mandell, Douglas, y Bennett's:** 2005. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed.2005 Elsevier;;chap 220.
- Prieto, A. I., F. Ramos-Morales y J. Casadesús.** 2004. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics*. **168(4):**1787-94.
- Pucciarelli, M. G., A. I. Prieto, J. Casadesús y F. García-Del Portillo.** 2002. Envelope Instability In DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella enterica*. *Microbiology*. **148:**1171-1182.
- Radman, M. y R. Wagner.** 1986. Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Annu Rev Gent* **20:**523-538.
- Reed, L. J. y H. Muench.** 1938. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am. J. Hy.* **27:**493-499.
- Reisenaue, A., L. S. Kahng, S. McCollum y L. Shapiro.** 1999a. Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator?. *J Bacteriol.* **181(17):**5135-9.
- Reisenaue, A., K. Quon, y L. Shapiro.** 1999b. The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J. Bacteriol.* **181:**2430-2439.
- Roberts, D., B. C. Hoopes, W. R. McClure y N. Kleckner.** 1985. IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell.* **43:**117-130.
- Robertson, G. T., A. Reisenaue, R. Wright, R. B. Jensen, A. Jensen, L. Shapiro, y R. M. Roop, II.** 2000. The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J. Bacteriol.* **182:**3482-3489.
- Rüssmann , H.** 2003. Bacterial type III translocation: a unique mechanism for cytosolic display of heterologous antigens by attenuated *Salmonella*. *Int J Med Microbiol.* **293(1):**107-12. Review.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T Maniatis.** 1989.. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Santos, R. L., R. M. Tsolis, A. J. Bäumlér y L. G. Adams.** 2003. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **36:**3-12.
- Sigwart, D. F., B. A. D. Stocker y D. Clements.** 1989. Effect of a purA mutation on efficacy of *Salmonella typhimurium* live vaccine vector. *Infect. Immun.* **57:**1858-1861.
- Sternberg, N.** 1985. Evidence that adenine methylation influences DNA-protein interactions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **164:**490-493.
- Steven, J. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, K. E. Klose, R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan.** 2001. DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect and Immun.* **69(12):** 7610–7615.
- Taylor, V. L., R. W. Titball y P. C. Oyston.** 2005. Oral immunization with a dam mutant of *Yersinia pseudotuberculosis* protects against plague. *Microbiology.* **151(Pt 6):**1919-26.
- Torreblanca, J., S. Marques, y J. Casadesús.** 1999. Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. *Genetics.* **152:**31-45.
- Torreblanca, J. y J. Casadesús.** 1996. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* and a novel dam-regulated locus. *Genetics.* **144:**15-26.
- Van der Woude, M., B. Braaten y D. Low.** 1996. Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **4:**5-9.

- Van der Woude, M. W. y D. A. Low.** 1994. Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **11**:605-618.
- Wion, D. y J. Casadesús.** 2006. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:183-192.
- Wright, R., C. Stephens y L. Shapiro.** 1997. The CcrM DNA methyltransferase is widespread in the alpha subdivision of proteobacteria, and its essential functions are conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **179**:5869-5877.

## **CAPÍTULO 2**

### **¿Inserción o Serovariedad?**

## Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 2

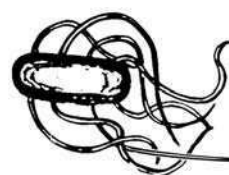
### Hechos

- ✓ Los resultados del Capítulo 1 revelaron diferencias en capacidad protectora entre la mutante SD1 de *S. Enteritidis*, portadora de una proteína Dam ts, y lo descrito para las mutantes de *S. Typhimurium* que carecen totalmente de la enzima.
- ✓ Contrariamente a lo que ocurre con la serovariedad Typhimurium, la información sobre mutantes de *S. Enteritidis* que carecen de Dam, es muy limitada. Esto impide realizar estudios comparativos entre mutantes *dam* de ambas serovariedades.
- ✓ Se ha demostrado que la infección de macrófagos con las serovariedades Enteritidis y Typhimurium puede generar en una respuesta inflamatoria diferente.

### Interrogantes:

Nos preguntamos entonces, si las características encontradas en la mutante SD1 (que difieren de las descritas para las mutantes *dam* de *S. Typhimurium*) están relacionadas con el fenotipo termosensible la proteína Dam o son propias de la serovariedad Enteritidis.

Para responder a este interrogante es necesario construir una mutante *dam* de *S. Enteritidis*, por delección, y analizar su interacción con el huésped, tanto en el modelo animal de infección como en la infección de células macrofágicas en cultivo.



## *Introducción*

---

## Introducción

### ***Salmonella*: un patógeno huésped-específico**

*Salmonella* spp. causa enfermedad en una gran variedad de animales, incluido el hombre. Algunas serovariedades como Enteritidis y Typhimurium pueden causar enfermedad en un amplio rango de huéspedes, mientras que para otras el rango es reducido; en este último caso se la define como una serovariedad “huésped específica”.

La patogénesis de las diferentes serovariedades de *Salmonella* está relacionada con factores que determinan interacciones diferenciales huésped-patógeno. Por ejemplo, la interacción de la bacteria con componentes de la inmunidad innata, como los fagocitos, es de central importancia tanto en el huésped murino como en el aviar. Así, la habilidad de *Salmonella* para sobrevivir dentro de las células del huésped es esencial para el establecimiento de la infección sistémica. En este contexto, el Sistema de Secreción Tipo Tres juega un papel fundamental en la invasión y la sobrevivencia dentro de los macrófagos para ambas serovariedades Enteritidis y Typhimurium (Galán J.E. y col., 1991; Amavisit P. y col., 2003). Por otro lado, es sabido que la muerte de *Salmonella* por los macrófagos depende de la activación por mediadores de la inflamación, como interferón gamma y de la inducción de oxígeno reactivo y óxido nítrico (NO). Además de ser una de las principales células efectoras de la inmunidad innata, los macrófagos sirven también como transporte de *Salmonella* hacia los tejidos del huésped y proveen un sitio protegido para la replicación bacteriana intracelular. Interesantemente, se han descrito diferentes respuestas de células macrofágicas ante la infección por distintas serovariedades de *Salmonella*, tanto en modelos experimentales animales como humanos (Schwan W.R. y col., 2000; Okamura M. y col., 2005; Babu U.S. y col., 2006; Kaiser M.G. y col., 2006; Simon R. y col., 2008).

### **Citotoxicidad mediada por *Salmonella* spp.**

Si bien la mayoría de los patógenos intracelulares emplean estrategias que previenen la muerte de la célula huésped, está demostrado que *Salmonella* causa citotoxicidad sobre las células que infecta. La muerte celular no sólo le provee a este patógeno un nicho intracelular para la replicación sino que también contribuye a la habilidad de la bacteria



para causar inflamación localizada, infección sistémica y colonización crónica (Fink S.L. y col., 2007).

### **Oxido nítrico y apoptosis**

Frente a una infección bacteriana, los macrófagos participan activamente liberando citoquinas que a su vez amplifican la señal del estímulo inflamatorio; esto contribuye a la liberación de lípidos bioactivos (prostaglandinas y leucotrienos) e intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno. Todos estos mediadores ejercen efectos citotóxicos sobre los patógenos. Sin embargo, una elevada síntesis de NO puede causar también daños al ADN del huésped. Por otro lado, el NO en altas concentraciones compite con el oxígeno por sitios de unión presentes en enzimas que participan en diversos caminos bioenergéticos (Costa N.J. y col., 2003). De esta forma, un exceso en la síntesis de NO puede conducir a la inhibición de la respuesta celular eucariota y finalmente, a la muerte por apoptosis (Cerquetti M.C. y col., 2002).

### **NF- $\kappa$ B y MAPK como integradores de la respuesta inflamatoria**

La gran mayoría de las respuestas celulares frente infecciones bacterianas se basan, en primera instancia, en la activación de vías de señalización. Por consiguiente, se activan diversos factores de transcripción que inducen la síntesis de enzimas proinflamatorias y de numerosos mediadores inflamatorios. La activación de la vía de NF- $\kappa$ B ha sido identificada como un evento central en la expresión de genes proinflamatorios durante la infección con *Salmonella* (Elewaut D. y col., 1999). Sin embargo, la regulación de la expresión de enzimas proinflamatorias como NOS-2 y COX-2, no depende solamente de la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, sino también de otras vías. Tal es el caso de las MAPKs (Proteína kinasa Activada por Mitógeno; MAPK) que actúan como punto de integración para múltiples señales, y están involucradas en la regulación de una amplia variedad de respuestas y procesos celulares.

### **Vía de NF- $\kappa$ B**

El factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), es una molécula muy conservada que participa en numerosos procesos biológicos en distintos órganos y tipos celulares. Ciertos mediadores inflamatorios y productos bacterianos como el LPS activan la vía provocando la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Una vez en el núcleo, este factor activa

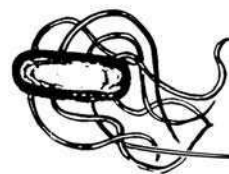
la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, angiogénesis y adhesión celular. De esta manera NF- $\kappa$ B. media la transcripción de citoquinas (IL-6, IL-12, IL-1 y TNF $\alpha$ ), quimioquinas, péptidos anti-microbianos y de numerosas proteínas de la fase aguda, moléculas de adhesión celular y vascular (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), factores de crecimiento endotelial vascular, y enzimas proinflamatorias específicas como NOS-2 y COX-2 (Silverman N. y col., 2001).

### **Vía de las MAPK**

En mamíferos, el término general MAPK comprende a una superfamilia de proteínas quinasas con especificidad serina/treonina-quinasa, que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos o por productos bacterianos como el LPS. La activación de las MAPKs en respuesta a estos estímulos controla el metabolismo celular, la expresión de diversos genes y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares muy complejos como migración, mitosis, diferenciación o supervivencia celular (Wada T. y col., 2004).

### **Participación de la proteína Dam en la virulencia de *Salmonella* spp.**

La proteína Dam cumple un importante papel en la virulencia de *Salmonella* spp. ya que actúa como regulador global de la expresión génica, afectando a una amplia gama de funciones celulares críticas (Camacho E.M. y col., 2005). Además, la falta de Dam origina alteraciones en la fisiología bacteriana, en la composición de la pared celular y en la secreción de proteínas (Pucciarelli M.G. y col., 2002; Giacomodonato M.N. y col., 2009). Balbontín R. y col. (2006) demostraron que las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* presentan patrones alterados de expresión de genes de virulencia.



*Hipótesis y  
Objetivos*

---

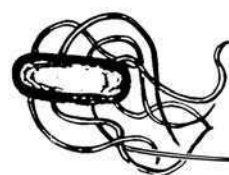
## Hipótesis y objetivos

**Hipótesis:** Las características distintivas encontradas en la cepa SD1 se explican, en parte, por la inserción del transposón en la última porción del gen *dam*, y en parte a las características propias de la serovariedad Enteritidis.

El objetivo de este capítulo es construir una mutante *dam* de *S. Enteritidis* por delección y analizar su interacción con el huésped, tanto en el modelo animal de infección como en la infección de células en cultivo.

### Objetivos específicos

1. Construcción y caracterización de una mutante *dam* de *S. Enteritidis* por delección ( $SE\Delta dam$ ).
2. Determinación de la capacidad protectora de la mutante  $SE\Delta dam$ .
3. Análisis de la respuesta inflamatoria generada por la mutante  $SE\Delta dam$  en macrófagos en cultivo.



*Desarrollo  
Experimental*

---

## Desarrollo Experimental

### 1. Obtención de una mutante *dam* de *S. Enteritidis* ( $SE\Delta dam$ ) por delección

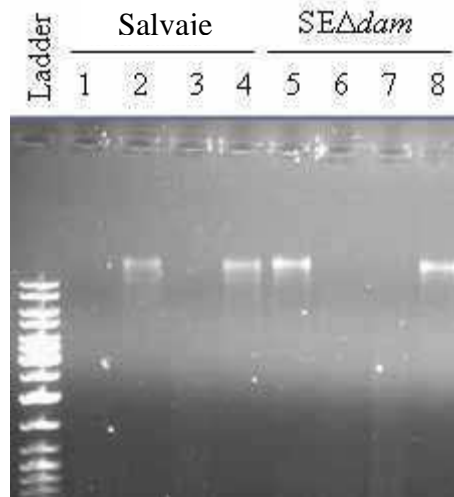
La mutante *dam* de *S. Enteritidis*,  $SE\Delta dam$ , se obtuvo mediante el método de mutagénesis dirigida descrito por Delgado M.A. y col. (2006).

#### 1.1. Comprobación del fenotipo *dam* de la cepa $SE\Delta dam$

Se comprobó en la nueva mutante la ausencia de metilación en secuencias GATC mediante enzimas de restricción (ver punto 1.2), y dos características fenotípicas de mutantes *dam*: la filamentación al ser cultivada en medio líquido y la sensibilidad a 2-AMP, un análogo de bases púricas (datos no mostrados).

#### 1.2. Estado de metilación del ADN de la mutante $SE\Delta dam$

La mutación *dam* fue confirmada por digestión con endonucleasas de restricción de ADN *MboI* (corta sólo los sitios GATC no metilados), *DpnI* (corta sólo los sitios GATC metilados) y *Sau3AI* (corta cualquier sitio GATC) como control. Mientras que las preparaciones de ADN provenientes de las cepas parental y mutante fue digerida por igual por *Sau3AI* (Fig. 2. 1, líneas 3 y 7), el ADN de la cepa parental fue digerido por *DpnI* pero no por *MboI* (Fig. 2. 1, líneas 1 y 2), y a la inversa, el ADN de  $SE\Delta dam$  fue digerido por *MboI* pero no por *DpnI* (Fig. 2. 1, líneas 5 y 6).



**Figura 2. 1. Patrón de metilación del ADN.** Tratamiento con enzimas de restricción del ADN genómico de las cepas parental (salvaje) y mutante *dam* (SE $\Delta$ dam) de *S. Enteritidis*. El ADN genómico fue aislado usando el *kit Puregene DNA isolation kit* (Gentra Systems). Dos  $\mu$ g de ADN fueron incubados con *Mbo*I, *Sau*3AI y *Dpn*I por 4 h a 37 °C (Promega). El ADN tratado fue analizado por electroforesis en geles de agarosa 0.7 % (p/v). Líneas: 1 a 4, ADN de cepa salvaje tratado con: 1, *Dpn*I; 2, *Mbo*I; 3, *Sau*3A y 4, sin enzima. Líneas 5 a 6, ADN de cepa SE $\Delta$ dam con: 5, *Dpn*I; 6, *Mbo*I; 7, *Sau*3A; 8, sin enzima.

## 2. Estudio de la atenuación y de la capacidad protectora de la mutante SE $\Delta$ dam

Se analizó la atenuación y la capacidad de generar protección de la cepa SE $\Delta$ dam carente de la enzima Dam. Como se mencionó anteriormente en el Capítulo 1, las mutantes de *Salmonella* spp. que carecen totalmente de actividad Dam, son altamente atenuadas (Heithoff D.M. y col., 2001; García del Portillo F. y col., 1999; Low D.A. y col., 2001). Para analizar si la falta total de la enzima Dam en nuestra nueva mutante SE $\Delta$ dam genera una atenuación de niveles similares, se determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) por vía i.g. Los resultados indicaron que la DL<sub>50</sub> de la cepa SE $\Delta$ dam ( $1 \times 10^6$  UFC / ratón), es superior a la de la cepa salvaje ( $1,7 \times 10^4$  UFC / ratón). Para confirmar que la atenuación en la virulencia se debía exclusivamente a la carencia de la proteína Dam, la cepa SE $\Delta$ dam se transformó con el plásmido pIZ833 que contiene el gen *dam* salvaje. Se observó que la cepa SE $\Delta$ dam complementada recuperó su virulencia (datos no mostrados).

Por otro lado, se estudió el grado de protección conferido por la mutante *SE $\Delta$ dam* a los animales inmunizados y desafiados con la cepa virulenta de *S. Enteritidis*. Los animales fueron inmunizados y desafiados como se detalla en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1. Veintiún días luego de la última inmunización los animales se desafiaron con la cepa virulenta y se registró diariamente la sobrevida de los mismos. Los resultados se muestran en la Tabla 2. 1. Sorprendentemente, el porcentaje de sobrevida de los ratones inmunizados fue similar al de los controles. Esto significa que, independientemente del esquema de inmunización utilizado, la cepa *SE $\Delta$ dam* no genera inmunidad protectora en el modelo murino.



**Tabla 2. 1. Estudios de protección en ratones inmunizados con la mutante SE $\Delta$ dam.**

<b>Inmunización UFC / animal</b>	<b>Desafío UFC / animal</b>	<b>Supervivencia / Número total</b>
<b>SE<math>\Delta</math>dam<sup>a</sup></b>	<b>S. Enteritidis #5694</b>	
<b>Una dosis</b>		
(ip) 1 x 10 <sup>4</sup>	(ip) 2 x 10 <sup>2</sup>	0/10
(ig) 1 x 10 <sup>4</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>7</sup>	0/10
(ig) 1 x 10 <sup>5</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>7</sup>	0/8
(ig) 5 x 10 <sup>5</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>7</sup>	0/10
(ig) 1 x 10 <sup>4</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>6</sup>	0/9
(ig) 1 x 10 <sup>5</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>6</sup>	0/10
(ig) 5 x 10 <sup>5</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>6</sup>	0/10
<b>Dos dosis</b>		
(ig) 5 x 10 <sup>5</sup>	(ig) 1 x 10 <sup>6</sup>	0/5 <sup>b</sup>
<hr/>		
SF (Grupo control)	(ip) 2 x 10 <sup>2</sup> (ig) 1 x 10 <sup>6</sup>	0/10 0/10

Ratones BALB/c fueron inoculados con una o dos dosis de la cepa mutante SE $\Delta$ dam y desafiados 21 días después de la última inmunización con 200 DL<sub>50</sub> (10<sup>7</sup> UFC) o 20 DL<sub>50</sub> (10<sup>6</sup> UFC) de la cepa virulenta. El número de sobrevivientes se registró por 30 días.

**a.** DL<sub>50</sub> ig: 1 x 10<sup>6</sup> UFC / ratón esto solo aclara cual es la DL50 no entiendo.

**b.** Cuatro de nueve animales murieron luego de recibir la segunda inmunización ig con 5 x 10<sup>8</sup> UFC de SE $\Delta$ dam. Los restantes cinco ratones fueron desafiados con la cepa salvaje.

SF: Solución fisiológica.

## **Conclusiones parciales**

La ausencia total de la proteína Dam en *S. Enteritidis* no le otorga a la mutante características de atenuación o protección comparables a las descritas para mutantes similares en la serovariedad Typhimurium (Heithoff D.M. y col., 1999 y 2001; García del Portillo F. y col., 1999; Low D.A. y col., 2001; Dueger E.L. y col., 2003; Mohler

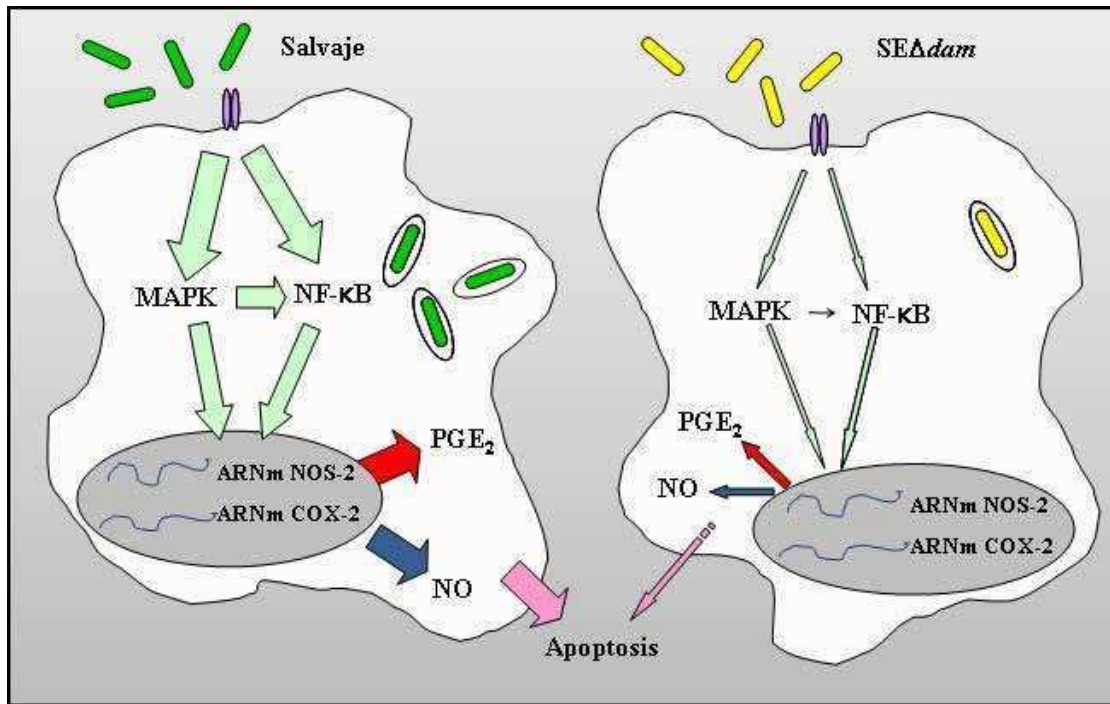
V.L. y col., 2006). Más aún, la mutante SE $\Delta$ dam mostró ser menos atenuada y menos protectora si se la compara con la mutante SD1 analizada en el Capítulo 1.

### **3. Interacción de la cepa SE $\Delta$ dam con macrófagos en cultivo**

*Los experimentos que se describen a continuación fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Nora Goren. Los resultados que se presentan en este punto forman parte de la Tesina de Licenciatura de Eugenia Hovsepián y han sido publicados en *Microbes and Infection*, 2008.*

Las cepas virulentas de *Salmonella* spp. pueden invadir, sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos. Durante este proceso, se desencadena una amplia variedad de respuestas celulares importantes en la determinación del resultado de la infección. Nos interesó conocer el resultado de la interacción entre la cepa de *S. Enteritidis* con una delección en el gen *dam* y macrófagos en cultivo.

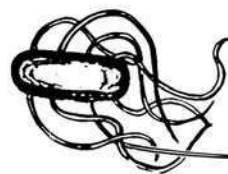
Se analizó la capacidad de la mutante *dam* para activar el camino de señalización de la respuesta inflamatoria en macrófagos (Fig. 2. 2). Para ello, macrófagos RAW 264.7 fueron infectados con las cepas mutante *dam* y salvaje de *S. Enteritidis*. Se comprobó que la mutante *dam* posee baja capacidad de invasión comparada con la cepa salvaje. Los macrófagos infectados con la cepa mutante *dam* expresaron bajos niveles de NOS-2 y COX-2 y produjeron menores cantidades de NO y prostaglandina GE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en comparación a aquellos infectados con la cepa salvaje. Además, se encontró que los niveles apoptóticos de los macrófagos RAW 264.7 infectados con la cepa mutante SE $\Delta$ dam son menores a los inducidos por la cepa salvaje. La cepa mutante SE $\Delta$ dam induce una respuesta inflamatoria atenuada sobre los macrófagos basada en una discreta activación de la vía de NF- $\kappa$ B. El esquema de la Fig. 2. 2 resume los resultados encontrados.



**Figura 2. 2. Dam y la respuesta inflamatoria en macrófagos.** La mutante *dam* de *S. Enteritidis* induce una respuesta inflamatoria atenuada en macrófagos RAW 264.7. La metilación por Dam participaría en la activación de ambas cascadas de señalización, MAPK y NF- $\kappa$ B, en la respuesta inflamatoria inducida por *Salmonella* spp. Por lo tanto la secreción de NOS-2 y COX-2 y la subsecuente producción de NO y PGE<sub>2</sub> se ven reducidas de forma significativa en células infectadas con cepas *dam* con respecto a células infectadas con la cepa salvaje. De la misma forma, se ve reducida la apoptosis de macrófagos infectados con la mutante *dam* de *Salmonella* spp.

## Conclusiones parciales

La interacción entre la cepa SE $\Delta$ *dam* y los macrófagos en cultivo induce una respuesta inflamatoria menor que la observada para la cepa virulenta de *S. Enteritidis*. Aparece aquí una diferencia importante entre las mutantes *dam* de la serovariedad Enteritidis y Typhimurium.



*Discusión*

---

## Discusión

Dadas las diferencias encontradas entre la mutante SD1 de *S. Enteritidis*, y las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* descritas en la bibliografía, se decidió generar una mutante de *S. Enteritidis* carente por completo de la enzima Dam y estudiar su capacidad protectora. Esta mutante, *SE $\Delta$ dam*, se construyó por mutagénesis dirigida utilizando el método descrito por Datsenko K.A. y B.L. Wanner (2000). La mutante *SE $\Delta$ dam* mostró tener los fenotipos esperados para toda mutante *dam*; filamentación, sensibilidad a 2-AMP y ausencia de metilación en secuencias GATC a lo largo de su genoma.

Los experimentos in vivo mostraron que la atenuación de la mutante *SE $\Delta$ dam* es significativamente menor a la descrita para las mutantes *dam* en la serovariedad de *Typhimurium* que carecen totalmente de la proteína (Heithoff D.M. y col., 1999 y 2001; García del Portillo F. y col., 1999; Low D.A. y col., 2001). Más aún, la mutante *SE $\Delta$ dam* es incluso menos atenuada que la mutante SD1, carente de los últimos 10 aminoácidos de la enzima Dam.

Con respecto a la capacidad protectora, en estudios previos, las mutante *dam* de *S. Typhimurium* han sido descritas como altamente protectoras (Heithoff D.M. y col., 2001). Una sola dosis de  $10^9$  UFC de mutante *dam* serovar *Typhimurium* protege significativamente ratones desafiados con hasta 10.000  $DL_{50}$  de la cepa desafío (Heithoff D.M. y col., 2001). Sorprendentemente, encontramos que la mutante *SE $\Delta$ dam* es incapaz de generar protección en ratones. Ninguno de los esquemas de inmunización ensayados indujo inmunidad protectora ante el desafío con la cepa virulenta, incluso ante la baja dosis de desafío de 20  $DL_{50}$ . Más aún, los animales que recibieron dos dosis de inmunización con  $5 \times 10^5$  UFC de *SE $\Delta$ dam*, se enfermaron luego de la segunda dosis de inmunización y 4 de 9 animales murieron antes del desafío (Tabla 1).

Si bien estos resultados fueron inesperados para *Salmonella* spp., se han descrito microorganismos en los que, la carencia de Dam no les confiere atenuación. Por ejemplo, Honma Y. y col. (2004) mostraron que para *Shigella flexneri*, una mutación en el gen *dam* no resulta en una atenuación significativa. La mutante *dam* de *S. flexneri* retiene la habilidad de invadir y crecer intracelularmente (Honma Y. y col., 2004).

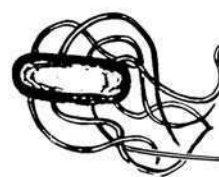
Similarmente, la mutante *SEΔdam* fue capaz de invadir células epiteliales en cultivo, de invadir y colonizar órganos profundos y de causar la muerte de ratones BALB/c inoculados con dosis mayores a  $10^6$  UFC (Noto Llana M., observaciones no publicadas).

La interacción de la mutante *SEΔdam* con macrófagos en cultivo mostró que la expresión de NOS-2 y COX-2, y la subsecuente producción de NO y PGE<sub>2</sub>, está reducida significativamente. Podemos concluir que la cepa atenuada *SEΔdam* induce una menor respuesta inflamatoria en los macrófagos infectados, en comparación con lo desencadenado por la cepa salvaje. Tanto los niveles de apoptosis observados como la liberación de los metabolitos inflamatorios NO y PGE<sub>2</sub> resultaron disminuidos en macrófagos infectados con la cepa mutante, en coincidencia con la leve activación observada de las vías de las MAPKs y de NF-κB. A nuestro entender, es la primera vez que se describe una alteración en la activación de p38 y ERK y una translocación defectuosa de p65 al núcleo en células infectadas con una mutante *dam* de *S. Enteritidis*.

Durante el curso de la invasión celular, el LPS bacteriano activa diversas cascadas de señalización, las que promueven cambios en la expresión de varios genes, incluyendo a aquellos que codifican para mediadores inflamatorios. Varios grupos de investigación han demostrado que el LPS es capaz de gatillar la activación de las MAPKs y de NF-κB en macrófagos, vía reconocimiento del TLR-4. Sin embargo, la participación de la proteína Dam en la activación de las vías de señalización eucariotas todavía es objeto de estudio.

Por otra parte, no sólo el LPS es capaz de activar la respuesta inflamatoria de macrófagos; otras moléculas de la bacteria, pueden estar implicadas en este proceso. Por ejemplo, la adquisición del Sistema de Secreción Tipo Tres (SSTT), le ha otorgado a *Salmonella* grandes ventajas, como la capacidad de introducir sus propias proteínas dentro de la célula eucariota. Asimismo, existen evidencias que involucran a más de una proteína efectora en la activación de macrófagos infectados con *Salmonella* (Cherayil B.J. y col., 2000; Drecktrah D. y col., 2005). Además, estudios similares en *Legionella pneumophila* han demostrado que tanto la activación de la vía de supervivencia celular mediada por NF-κB, como la estimulación de la muerte en ausencia de la translocación nuclear de este factor, dependen de un Sistema de Secreción Tipo Cuatro. Las evidencias más recientes se basan en que cepas de *L. pneumophila* deficientes en este sistema no

son capaces de generar citotoxicidad suficiente como para inducir la muerte del huésped (Losick V.P. y col., 2006). Por lo tanto, la falla característica de las mutantes *dam* de *S. Enteritidis* para activar una respuesta inflamatoria completa luego de infectar a los macrófagos, podría estar relacionada con deficiencias en una o más de sus proteínas efectoras. Una reciente publicación apoya esta hipótesis, y ha demostrado que la proteína efectora SopB de *Salmonella* estimula la producción de NO luego de una invasión prolongada de los macrófagos (Drecktrah D. y col., 2005). Además, se descubrió que SopE2, una proteína expresada por todas las cepas de *Salmonella* y que es introducida en la célula huésped a través del SSTT, está involucrada en la regulación positiva de NOS-2 en los macrófagos (Cherayil B.J. y col., 2000) y en la activación de las MAPKs p38 y ERK en células epiteliales en cultivo (Huang F.C. y col., 2004). También ha sido sugerido que la expresión de NOS-2 podría estar regulada por señales activadas por SopE2, y que las proteínas de invasión SipB, SipC y SipD facilitarían su translocación (Huang F.C. y col., 2004).



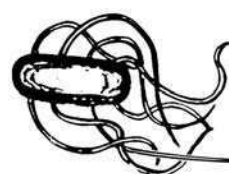
*Conclusiones*



## Conclusiones

La ausencia de la enzima Dam en la serovariedad Enteritidis genera un fenotipo diferente al descrito en la serovariedad Typhimurium (Heithoff D.M. y col., 1999 y 2001; García del Portillo F. y col., 1999; Low D.A. y col., 2001; Dueger E.L. y col., 2003; Mohler V.L. y col., 2006). Los estudios realizados en el modelo animal muestran que la cepa SE $\Delta$ dam es menos atenuada y menos protectora que la mutante *dam* de *S.* Typhimurium. Más aún, la mutante SE $\Delta$ dam mostró ser menos atenuada y menos protectora que la mutante SD1 analizada en el Capítulo 1.

La interacción entre la cepa SE $\Delta$ dam y macrófagos en cultivo resultó en una respuesta inflamatoria menor a la que induce la cepa salvaje. La menor expresión de NOS-2 en células infectadas con SE $\Delta$ dam muestra una diferencia con respecto a lo descrito para las mutantes *dam* de la serovariedad Typhimurium. Sobre la base de estos resultados podemos concluir que parte de las diferencias encontradas entre las mutantes *dam* de *S.* Enteritidis (SD1 y SE $\Delta$ dam) con respecto a lo descrito para las mutantes *dam* de *S.* Typhimurium, son propias de cada serovariedad.



***Materiales y  
Métodos***

---

# Materiales y Métodos

## 1. Generación de la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

Para la construcción de la mutante SE $\Delta$ *dam*, se utilizó la cepa salvaje de *S. Enteritidis* #5694. La delección del gen *dam* se realizó mediante el método de mutagénesis dirigida descrito por Datsenko K.A. y B.L. Wanner (2000). En “Materiales y Métodos” del Capítulo 4 se describe en detalle esta técnica como así también las cepas, medios de cultivos, plásmidos, *primers*, etc. utilizados.

## 2. Caracterización fenotípica de la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

Los estudios de sensibilidad a 2-AMP, filamentación y la determinación de estado de metilación del ADN se llevaron a cabo de la misma forma que se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

## 3. Estudio de la virulencia y capacidad protectora de la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

La metodología utilizada para el estudio de la virulencia y protección de la mutante *dam*, se realizó de la misma forma que se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1 con algunas pequeñas variantes. Brevemente, las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio LB en agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.6 (DO<sub>600</sub>). Luego, las bacterias se centrifugaron a 10.00 r.p.m. / min. y se las lavó en solución salina estéril. Se utilizaron diluciones seriadas para infectar grupos de ratones BALB/c en forma intraperitoneal (i.p.) con 200  $\mu$ l o intragástrica (i.g.) con 300  $\mu$ l. La supervivencia de los ratones se registró por 30 días. La DL<sub>50</sub> se calculó por el método descrito por Reed L.J. y H. Muench (1938). Para los estudios de protección, los ratones se inmunizaron con la mutante *dam* vía i.p. o vía i.g. con: i) una sola o ii) dos dosis, separadas por una semana. Diferentes dosis de la cepa vacuna fueron utilizadas por cada ruta de inmunización. Veintiún días luego de la última inmunización los animales se desafiaron con 200 y 20 DL<sub>50</sub> de la cepa virulenta.

#### **4. Estudio de la interacción de la mutante *dam* de *S. Enteritidis* con macrófagos en cultivo**

*Estos experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Nora Goren y forman parte de la Tesina de Licenciatura de Eugenia Hovsepian. Los detalles de Metodología han sido publicados en *Microbes and Infection*. 10:1431-1439, 2008.*



*Referencias  
Bibliográficas*

---

## Referencias bibliográficas

- Amavisit, P., D.Lightfoot, G.F. Browning y P.F.Markham.** 2003. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol.* **185(12):**3624-35.
- Babu,U.S., D.W. Gaines, H. Lillehoj y R.B. Raybourne.** 2006. Differential reactive oxygen and nitrogen production and clearance of *Salmonella* serovars by chicken and mouse macrophages. *Dev Comp Immunol.* **30(10):**942-53.
- Balbontin, R., G. Rowley, M.G. Pucciarelli, J. Lopez-Garrido, Y. Wormstone, S. Lucchini, F. Garcia del Portillo, J.C. Hinton y J. Casadesus.** 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **188:** 8160e8168.
- Camacho, E.M., A. Serna y J. Casadesús.** 2005. Regulation of conjugal transfer by Lrp and Dam methylation in plasmid R100.*Int Microbiol.* **8(4):**279-85.
- Cerquetti, M.C., N.B. Goren, A.J. Ropolo, D. Grasso, M.N. Giacomodonato y M.I. Vaccaro.** 2002. Nitric oxide and apoptosis induced in Peyer's patches by attenuated strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun.* **70(2):**964-9.
- Costa, N.J, C.C. Dahm, F. Hurrell, E.R. Taylor y M.P. Murphy.** 2003. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid Redox Signal.* **5(3):**291-305.
- Cherayil, B.J., B.A. McCormick y J. Bosley.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium-dependent regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by invasins SipB, SipC, and SipD and effector SopE2.*Infect Immun.* **68(10):**5567-74.
- Datsenko, K.A. y B.L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.*Proc Natl Acad Sci.U.S.A.* **97(12):**6640-5.
- Delgado, M. A., C. Mouslim, y E. A. Groisman.** 2006. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol. Microbiol.* **60:**39-50.
- Drecktrah, D., L.A. Knodler, K. Galbraith y O. Steele-Mortimer.** 2005. The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol.* **7:**105e113.
- Dueger, E. L., J. K. House, D. M. Heithoff y M. J. Mahan.** 2003a. *Salmonella* DNA adenine methylase mutants elicit early and late onset protective immune responses in calves. *Vaccine.* **21(23):**3249-58.
- Elewaut, D., J.A. DiDonato, J.M. Kim, F. Truong, L. Eckmann y M.F. Kagnoff.** 1999. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria.*J Immunol.* **163(3):**1457-66.
- Fink, S.L. y B.T. Cookson.** 2007 Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol.* **9(11):**2562-70. Epub 2007 Aug 20. Review.
- Galán, J.E. y R. 3rd Curtiss.** 1991. Distribution of the *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(9):**2901-8.

- García del Portillo, F., M. G. Pucciarelli, y J. Casadesús.** 1999. DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella typhimurium* Show Defects In Protein Secretion, Cell Invasion, And M Cell Cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:11578-11583.
- Giacomodonato, M.N., S.H. Sarnacki, M.N. Llana, A.S. García Cattaneo, S. Uzzau, S. Rubino y M.C. Cerquetti.** 2009. Impaired synthesis and secretion of SopA in *Salmonella Typhimurium* dam mutants. *FEMS Microbiol Lett.* **292(1)**:71-7.
- Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J Mahan.** 1999 An Essential Role For DNA Adenine Methylation In Bacterial Virulence. *Science*, 284(**5416**):967-70.
- Heithoff, D. M., E. Y. Enioutina, R. A. Daynes, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, y M. J. Mahan.** 2001. *Salmonella* DNA Adenine Methylase Mutants Confer Cross-Protective Immunity. *Infect and Immun.* **69(11)**:6725–6730.
- Honma, Y., R.E. Fernandez y A. T. Maurelli.** 2004. A DNA adenine methylase mutant of *Shigella flexneri* shows no significant attenuation of virulence. *Microbiology* **150**:1073-1078.
- Huang, F.C., A. Werne, Q. Li, E.E. Galyov, W.A. Walker y B.J. Cherayil.** 2004. Cooperative interactions between flagellin and SopE2 in the epithelial interleukin-8 response to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect. Immun.* **72**: 5052e5062.
- Kaiser, M.G., J.H. Cheeseman, P. Kaiser y S.J. Lamont.** 2006. Cytokine expression in chicken peripheral blood mononuclear cells after in vitro exposure to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poult Sci.* **85(11)**:1907-11.
- Losick, V. P. y R. R. Isberg.** 2006. NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J Exp Med.* **203(9)**:2177-89.
- Low, D. A., N. J. Weyand y M. J. Mahan.** 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* **69(12)**: 7197–7204.
- Mohler, V. L., D. M. Heithoff, M. J. Mahan, K. H. Walker, M. A. Hornitzky, C. S. McConnell, L. W. Shum y J. K. House.** 2006. Cross-protective immunity in calves conferred by a DNA adenine methylase deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Vaccine.* **27;24(9)**:1339-45.
- Okamura, M., H. S. Lillehoj, R. B. Raybourne, U. S. Babu, R. A. Heckert, H. Tani, K. Sasai, E. Baba y E. P. Lillehoj.** 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol.* **107(3-4)**:327-35.
- Pucciarelli, M. G., A. I. Prieto, J. Casadesús y F. García del Portillo.** 2002. Envelope Instability In DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella enterica*. *Microbiology* **148**:1171-1182.
- Reed, L. J. y H. Muench.** 1938. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-499.
- Schwan, W.R., X.Z. Huang, L. Hu y D. J. Kopecko.** 2000. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun.* **68(3)**:1005-13.
- Silverman, N. y T. Maniatis.** 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15(18)**:2321-42. Review.
- Simon, R. y C. E. Samuel.** 2007. Innate interferon response in macrophage and epithelial cells infected with wild-type compared to DNA adenine methylase and flagellin mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Interferon Cytokine Res.* **27(4)**:317-27.

- Simon, R. y C. E. Samuel.** 2008. Interleukin-1 beta secretion is activated comparably by FliC and FljB flagellins but differentially by wild-type and DNA adenine methylase-deficient *Salmonella*. *J Interferon Cytokine Res.* **28(11):**661-6.
- Wada, T. y F. Candotti.** 2008. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **8(6):**510-4. Review.



## **CAPÍTULO 3**

**¿Un defecto en la secreción de proteínas efectoras?**

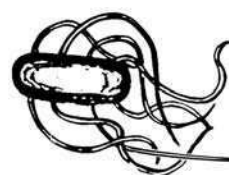
## Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 3

### Hechos

- ✓ La capacidad de *Salmonella* spp. para invadir e inducir una respuesta inflamatoria en los tejidos del huésped depende, en parte, de la acción de las proteínas efectoras bacterianas sobre las células que infecta.
- ✓ Como se describió en el Capítulo 2, la mutante *SE $\Delta$ dam* presenta menor capacidad de invasión e induce una menor respuesta inflamatoria en células en cultivo con respecto a la producida por la cepa salvaje.

### Interrogantes:

¿Por qué la mutante *SE $\Delta$ dam* invade menos? ¿Por qué induce una menor respuesta inflamatoria? ¿Cómo afecta la ausencia de Dam la expresión y secreción de las proteínas efectoras? cultivo.



## *Introducción*

---

## Introducción

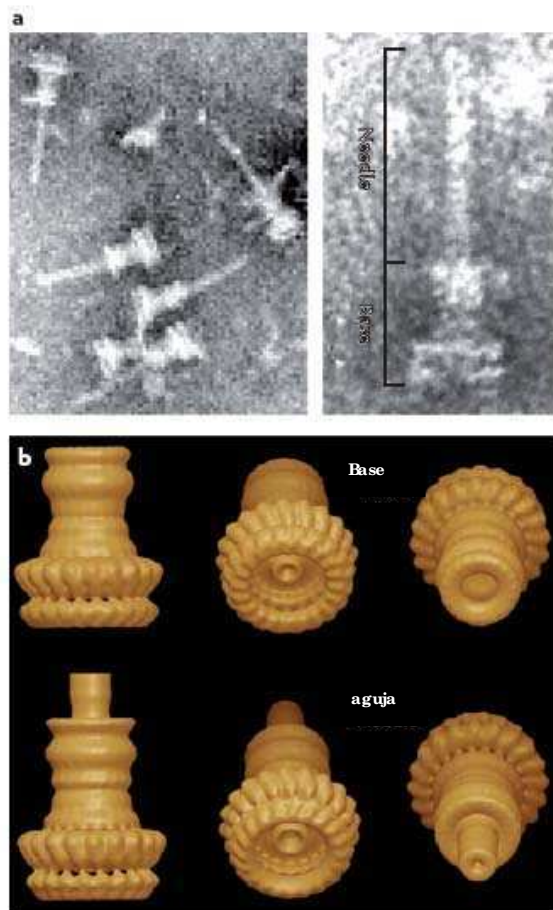
### Sistemas de secreción

Durante su larga co-evolución junto a su huésped, *Salmonella* spp. ha desarrollado un sofisticado mecanismo de virulencia para manipular las funciones de la célula huésped en beneficio propio. Este incluye a un sistema de secreción especializado capaz de “inyectar” un grupo de efectores bacterianos directamente al citosol de la célula huésped. Dicho sistema, denominado Sistema de Secreción Tipo Tres (SSTT) juega un papel central en la interacción bacteria-huésped. *S. Typhimurium* posee dos SSTT (SSTT-1 y SSTT-2), que ejercen su función en diferentes estadios del ciclo patogénico y se encuentran codificados en islas de patogenicidad separadas. La Isla de Patogenicidad-1 de *Salmonella* (SPI-1) codifica para el SSTT-1 y la SPI-2 codifica para el SSTT-2 (Hansen-Wester I. y M. Hensel, 2001). El SSTT-1 es esencial para la invasión de células no fagocíticas, se expresa extracelularmente, cuando la bacteria se encuentra en el lumen intestinal, y participa durante la fase inicial de la infección intestinal (Galán J.E., 2001; Zhou D. y J. Galán, 2001). El SSTT-2 se induce intracelularmente, es esencial para la supervivencia y proliferación de la bacteria dentro de la célula huésped y para el desarrollo de la fase sistémica de la infección (Waterman S.R. y D.W. Holden, 2003). Luego del proceso de invasión, *S. Typhimurium* reside intracelularmente en una vacuola denominada Vacuola que Contiene a *Salmonella* (VCS). En este estadio de la infección el SSTT-2 dirige la maduración de la VCS, previene la muerte oxidativa, facilita la diseminación sistémica y podría modular la respuesta inmune (Waterman S.R. y D.W. Holden, 2003; Kuhle V. y M. Hensel, 2004; Cheminay C. y col., 2005).

### Isla de Patogenicidad de *Salmonella* spp.

Las Islas de Patogenicidad representan elementos genéticos diferentes que codifican factores de virulencia en las cepas patógenas y han sido adquiridas evolutivamente por transferencia horizontal de genes (Hentschel U. y J. Hacker, 2001). Hasta el momento, considerando todas las serovariedades, se han descrito diecisiete Islas de Patogenicidad de *Salmonella* spp. (Vernikos G.S. y J. Parkhill, 2006), que han sido adquiridas durante la evolución de la bacteria (Marcus S.L. y col., 2000). Sin embargo, las dos SPIs más grandes, SPI-1 y SPI-2, son las que presentan un papel central en la patogénesis de

*Salmonella* spp. La SPI-1 se encuentra localizada en el centisoma 63 del cromosoma de *S. Typhimurium*. La función de la SPI-1 parece ser requerida durante los primeros estadios de la infección sistémica, así como también en la patogénesis de las infecciones gastrointestinales localizadas (Hansen-Wester I. y M. Hensel, 2001). La SPI-2 está localizada en el centisoma 30.7 del cromosoma de *S. Typhimurium* (Uchiya K. y T. Nikai, 2005) y es esencial para el desarrollo de la fase intracelular de la infección por *S. Typhimurium*. La SPI-1 codifica para los componentes estructurales y para las proteínas efectoras del SSTT-1. Las proteínas codificadas por la SPI-1 se ensamblan para formar la “jeringa” del SSTT-1, una estructura multi-proteica que atraviesa la membrana interna y externa de la bacteria (Fig. 3. 1) (Kubori T. y col., 2001).



**Figura 3. 1.** Estructura del Sistema de Secreción Tipo Tres de *Salmonella* (SSTT-1). A) Microfotografía electrónica del complejo de “aguja” (NC) purificado a partir de *S. Typhimurium*. B) Criomicroscopía electrónica e imágenes de superficie de la estructura de la base y NC del SSTT-1 de *S. Typhimurium*.

Los componentes de la membrana interna de esta estructura son homólogos al cuerpo basal de los flagelos, sugiriendo una relación evolutiva entre ambas organelas. Es más, se observó que componentes del SSTT poseen secuencias de aminoácidos similares a

las proteínas flagelares (Zhou D. y J. Galán, 2001). La “jeringa” del SSTT-1 consiste en una base anillada compuesta por proteínas codificadas en la SPI-1: PrgK, PrgH e InvG y una estructura en forma de “aguja” que está compuesta por una única proteína PrgI (Kubori T. y col., 2000). El ensamble de esta estructura se produce de una manera ordenada, en pasos separados. Una vez que la estructura de la “jeringa” está conformada, el Sistema de Secreción ya puede exportar las proteínas bacterianas que forman el Complejo de Translocación en la membrana eucariótica. Este complejo de translocación está integrado por un grupo de proteínas secretadas denominadas translocasas (SipB, SipC y SipD) que son esenciales para que se produzca la correcta translocación de las proteínas efectoras bacterianas al citoplasma de la célula huésped (Fu Y. y J.E. Galán, 1998; Galyov E.E. y col., 1997; Hardt W.D. y J.E. Galán, 1997). Además de las proteínas que actúan como translocasas la SPI-1 codifica para un grupo de proteínas denominadas efectoras: SipA, AvrA y SptP (Kaniga K., y col., 1995<sup>a,b</sup>, 1996).

Existen otras proteínas efectoras cuya secreción es mediada por el SSTT-1 pero se encuentran codificadas fuera de la SPI-1. Entre ellas se encuentran SopA, SopB, SopD, SopE1, SopE2, SspH1 y SlrP (Bakshi C.S. y col., 2000; Hardt W.D., y J.E. Galán, 1997; Stender S. y col., 2000; Wood M.W. y col., 2000). Se cree que cuando la bacteria está en contacto íntimo con la célula epitelial del tracto intestinal, la “jeringa” transloca las proteínas secretadas (efectores) al citoplasma de la célula huésped. Dichos efectores bacterianos, una vez dentro de la célula, interactúan con distintos blancos celulares. Estas interacciones inducen rearrreglos de los filamentos de actina, generación de filopodios y lamelipodios (*ruffling*) y macropinocitosis en células epiteliales no fagocíticas, promoviendo la internalización de la bacteria (Zhou D. y J.E. Galán, 2001) (Fig. 3. 2). Las proteínas que participan en este proceso de invasión de células epiteliales son SipA, SopA, SopB, SopD y SopE<sub>2</sub> (Raffatellu M. y col., 2005). Además, se han descrito funciones adicionales para cada uno de estos efectores.

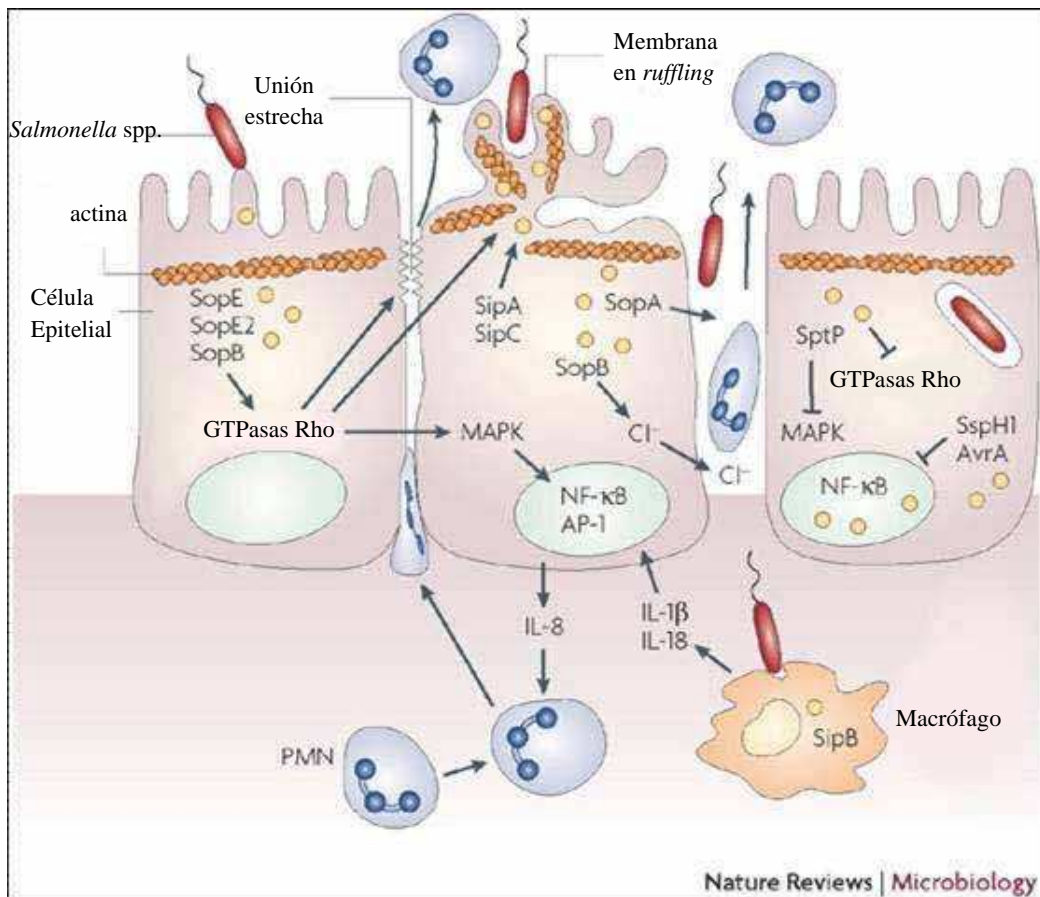
## **SopA**

Algunos efectores han sido más estudiados que otros, con respecto a SopA se le han atribuido múltiples funciones, entre ellas se ha propuesto que su extremo amino terminal participa en la evasión de la bacteria durante la infección, mientras que el extremo carboxi terminal podría estar involucrado en el proceso inflamatorio a través de

su actividad como E3 ligasa (Zhang Y. y col., 2006). SopA podría ubiquitinar tanto sustratos bacterianos como de la célula huésped para manipular la respuesta proinflamatoria del huésped (Zhang Y. y col., 2005). En este sentido, se ha demostrado que SopA actúa conjuntamente con otros efectores de la SPI-1 para promover la producción de quimioquinas involucradas en la migración de PMN a la mucosa intestinal en el modelo bovino (Zhang S. y col., 2003). En cuanto a la localización, Layton A.N. y col. (2005) observaron en cultivo de células epiteliales que SopA se localiza en las mitocondrias de la célula huésped.

## **SopB**

La proteína SopB es una inositol fosfato fosfatasa que tiene una amplia capacidad para hidrolizar inositol fosfatos y fosfolípidos (Feng Y. y col., 2001). Este efector cumple un papel importante en la respuesta inflamatoria y en la secreción de fluidos en el modelo bovino de enterocolitis (Zhang S. y col., 2002) y es considerado como una nueva enterotoxina bacteriana (Wallis T. y E.E. Galyov, 2000). SopB contribuye en la expansión de la vesícula que contiene a *Salmonella* (VCS) (Patel J.C. y J.E. Galán, 2005), contribuye a la maduración de la VCS (Hernández L.D. y col., 2004; Mallo G.V. y col., 2008), y es un factor importante en el establecimiento del nicho intracelular de *S. Typhimurium*. Además, SopB participa durante los estadios tempranos y tardíos de la enfermedad favoreciendo la invasión de células no fagocíticas (Bakowski M.A. y col., 2007; Patel J.C. y J.E. Galán. 2006; Raffatellu M. y col., 2005) y estimulando la producción de la enzima iNOS en la célula huésped luego de la invasión (Drecktrah D. y col., 2005). Experimentos realizados en cultivos celulares demuestran que SopB es translocado a través del SSTT-1 durante la primera fase de la infección y que persiste al menos 12 horas (Drecktrah D. y col., 2005), localizándose en diferentes compartimientos celulares a lo largo de la infección. En un primer momento, SopB se encuentra en la membrana plasmática para mediar la entrada bacteriana, y posteriormente se ubica en la VCS donde es requerido para la replicación bacteriana (Patel J.C. y col., 2009).

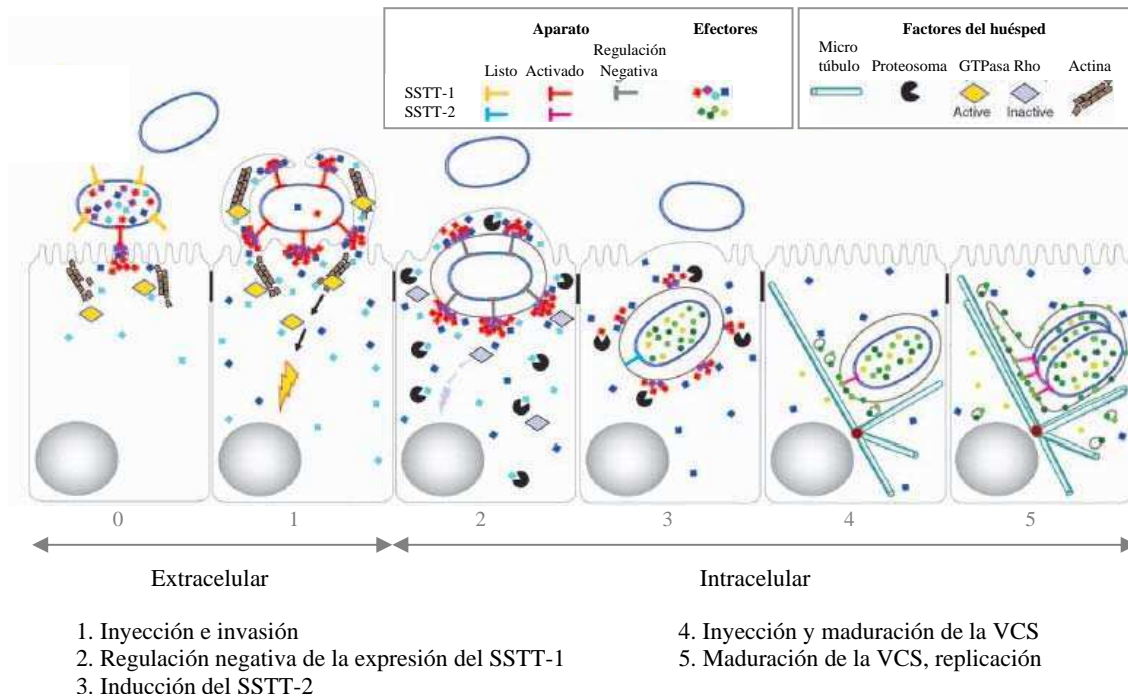


**Figura 3. 2. El SSTT-1 induce cambios en la célula huésped.** En contacto con la célula epitelial, *Salmonella* spp. ensambla el SSTT-1 y transloca los efectores (esferas amarillas) dentro del citoplasma eucarionte. Los efectores tales como SopE, SopE<sub>2</sub> y SopB activan la GTPasa Rho del hospedador resultando en un reordenamiento del citoesqueleto de actina (efecto de *ruffling*), inducción de los caminos de Proteína kinasa Activada por Mitógeno (MAPK) y desestabilización de las uniones estrechas intercelulares. Los cambios en el citoesqueleto de actina, que son luego también modulados por las proteínas de unión a actina SipA y SipC, llevan a la endocitosis de la bacteria (efecto de *ruffling*). La señalización por MAPK activa el factor transcripcional Proteína Activadora-1 (AP-1) y el factor nuclear-κB (NF- κB), los cuales inducen la producción de interleuquina 8 (IL-8). SipB induce la activación de caspasa-1 en macrófagos, con la liberación de IL-1β e IL-18 aumentando la respuesta inflamatoria. Además, SopB con su actividad inositol fosfatasa estimula la secreción de Cl<sup>-</sup>. La desestabilización de la unión estrecha entre células, permite la trans migración de PMNs de la superficie basolateral a la apical, pérdida de fluidos paracelulares y acceso de la bacteria a la superficie basolateral. Sin embargo, la trans migración de los PMN también ocurre en ausencia de la ruptura de las uniones estrechas y es promovida también por SopA. El citoesqueleto de actina es restaurado y la señalización de MAPK es detenida por actividades enzimáticas de SptP. Esto también resulta en una modulación disminuida de la respuesta inflamatoria, en la que también participa SspH1 y AvrA inhibiendo la activación de NF- κB.



## **Regulación de la expresión génica de la SPI-1 y la SPI-2**

La expresión de los genes de la SPI-1 y la SPI-2 está altamente regulada de una manera temporal y espacial (Fig. 3. 3) (Hansen-Wester I. y M. Hensel, 2001). El control de los genes de invasión, por ejemplo, permite la expresión del SSTT-1 en el punto de infección más productivo para la virulencia de modo que la invasión sea exitosa. Es probable que al llegar al íleo, *S. Typhimurium* cense las condiciones ambientales locales y luego induzca la cascada regulatoria que le permite la expresión del SSTT-1. Se ha demostrado que las condiciones ambientales que desafían a la bacteria en el intestino, como ser baja tensión de oxígeno, pH básico y alta osmolaridad, regulan positivamente la expresión del SSTT-1 modulando fundamentalmente la transcripción del gen *hilA*. La tensión de oxígeno constituye un regulador clave de la expresión de los genes de invasión, de hecho, se observa una máxima expresión de los genes de la SPI-1 bajo condiciones limitantes de oxígeno (Bajaj V. y col., 1996; Jones B.D. y S. Falkow, 1994; Russell D.A. y col., 2004). Si bien las señales ambientales han sido identificadas, poco se sabe acerca de cómo estas señales son recibidas e interpretadas por los reguladores genéticos de la invasión. Con respecto a la SPI-2, las condiciones ambientales que encuentra *S. Typhimurium* dentro de la VCS son las que inducen la expresión de los genes de la SPI-2. Este Sistema de Secreción se expresa bajo condiciones limitantes de nutrientes, incluyendo bajo magnesio o fosfato y bajo pH (Altier C., 2005; Cirillo D.M. y col., 1998; Deiwick J. y col., 1999; Lee A.K. y col., 2000; Miao E.A. y col., 2002). La respuesta diferencial a los cambios ambientales, permite la expresión de los genes necesarios para cada fase de la infección en el momento y en el microhábitat adecuado.

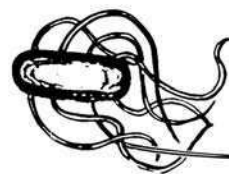


**Figura 3. 3. Esquema general de la “inyección” de los efectores de *Salmonella* spp. y la respuesta del huésped durante la infección de células del epitelio intestinal.** La bacteria llega al lumen intestinal, censa las condiciones ambientales locales y luego induce la cascada regulatoria que le permite la expresión del SSTT-1 (amarillo) (0). Se cree que cuando la bacteria está en contacto íntimo con la célula epitelial, la “jeringa” (SSTT-1 activo) (rojo) transloca las proteínas efectoras (cuadrados) al citoplasma de la célula huésped. Dichos efectores bacterianos, una vez dentro de la célula, interactúan con distintos blancos celulares. Estas interacciones inducen rearrreglos de los filamentos de actina, permitiendo el *ruffling* de la membrana y promoviendo la internalización de la bacteria (1). Luego, más SSTT-1 son activados, acelerando así la inyección de los efectores, la inducción de la señal GTPasa Rho y la invasión bacteriana (2). Una vez dentro de la célula huésped, *Salmonella* regula negativamente la expresión del SSTT-1. Luego de la formación de la VCS, la bacteria comienza a expresar el SSTT-2 (celeste). El pH ácido de la vacuola desencadena la inyección de los efectores de SSTT-2 (círculos) (3), los cuales interactúan con la red de microtúbulos del huésped, manipulan el tráfico de vesículas (4) y de esa manera guían la maduración de la VCS que permite la replicación bacteriana (5) (Schlumberger M.C. y W.D. Hardt. 2006).

### **Influencia de la metilación por Dam en la secreción de proteínas pertenecientes al SSTT**

Las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* muestran una reducida capacidad para interactuar con el epitelio intestinal, ya que presentan dificultades para invadir las células

epiteliales (García del Portillo F. y col., 1999). Esta dificultad se relacionó con una reducida secreción de dos proteínas de invasión (InvJ y SipC) codificadas por la SPI-1 (García del Portillo F., y col., 1999, Balbontín R. y col., 2006). Balbontín R. y col. (2006) demostraron que las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* presentan patrones alterados de expresión de genes de virulencia. Mediante estudios en cultivos líquidos, observaron que la mayoría de los genes analizados (119 versus 34) son reprimidos por la metilación por Dam, entre ellos ciertos genes flagelares y fimbriales. En el caso de *Yersinia pseudotuberculosis* se observó que la sobreproducción de la proteína Dam permite la secreción de efectores proteicos del SSTT en condiciones bajo las cuales la cepa salvaje no los secreta; de esta manera se altera la respuesta inmune del huésped a los antígenos del patógeno (Badie G. y col., 2004; Julio S.M. y col., 2001 y 2002, Fälker S. y col., 2006). Recientemente, se demostró que la expresión alterada de la SPI-1 en las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* se debe a la existencia de bajos niveles del principal activador transcripcional de la SPI-1, HilD. López-Garrido J. y J. Casadesús (2010) demostraron que la regulación de la SPI-1 por Dam requiere de HilD, mientras que HilA, HilC e InvF no serían indispensables. En este caso, existen evidencias que la metilación por Dam podría ejercer un efecto en la expresión de genes relacionados con la regulación de los activadores a nivel post transcripcional y por lo tanto una regulación indirecta sobre la expresión de *hilD* (López-Garrido J. y J. Casadesús, 2010).



*Hipótesis y  
Objetivos*

---

## Hipótesis y objetivos

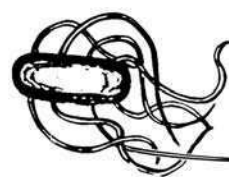
**Hipótesis:** La ausencia de Dam afecta la expresión y/o secreción de las proteínas efectoras de *Salmonella* que participan en el proceso de invasión.

Se propone estudiar los efectos de la carencia de la proteína Dam sobre la síntesis y secreción de los efectores proteicos SopA y SopB, dependientes del SSTT codificado por la SPI-1 de *Salmonella* spp.

*Debido a que la gran mayoría de la información relacionada con la expresión y secreción de las proteínas efectoras de Salmonella proviene de experimentos realizados en S. Typhimurium, algunos experimentos se realizarán utilizando cepas de esta serovariedad. De esta forma, será posible analizar la expresión y secreción de proteínas efectoras utilizando cepas de S. Typhimurium marcadas con el epítoto FLAG en los genes de interés.*

Para demostrar nuestra hipótesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Construir y caracterizar fenotípicamente cepas *dam* de *S. Typhimurium* con los genes *sopA* y *sopB* marcados con el epítoto FLAG.
2. Analizar la expresión y secreción de SopA y SopB en cepas *dam* de *S. Typhimurium* marcadas con el epítoto FLAG, mediante *Western blot*.
3. Analizar la expresión de los genes *sopA* y *sopB* en cepas mutantes *dam* de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, mediante PCR en tiempo real.



*Desarrollo  
Experimental*

---

## Desarrollo Experimental

### 1. Obtención de las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* con los genes *sopA* y *sopB* marcados con el epítotope FLAG

Las cepas mutantes *dam* de *S. Typhimurium* con los genes *sopA* o *sopB* marcados con el epítotope FLAG, se obtuvieron mediante la técnica de transducción. La mutación  $\Delta dam-230 zge-6313::Tn10dCm$  de la cepa de *S. Typhimurium* SV4712 (provista por el Dr. Casadesús) se transfirió a las cepas virulentas SSM2795 (SopA-FLAG) y SSM2796 (SopB-FLAG). De este modo se obtuvieron las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* llamadas STD2795 y STD2796 con las proteínas SopA y SopB marcadas con el epítotope FLAG, respectivamente. Las cepas complementadas se obtuvieron mediante electrotransformación con el plásmido pIZ833, portador del gen *dam* salvaje y se las denominó STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833.

### 2. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes *dam* marcadas

Las cepas mutantes *dam* de *S. Typhimurium* con los efectores SopA o SopB marcados con FLAG, se caracterizaron estudiando el fenotipo de ausencia de actividad Dam de la misma forma que se realizó para la mutante SD1 y SE $\Delta dam$  en los capítulos anteriores.

#### 2.1. Crecimiento en medio sólido

Las mutantes STD2795 (Fig. 3. 4 A) y STD2796 (datos no mostrados) se sembraron en aislamiento en placas de TSA y se incubaron a 37 °C. Ambas mutantes presentan colonias con un contorno no definido y de mayor tamaño respecto de la cepa salvaje. Las cepas complementadas muestran colonias con bordes no definidos pero de igual tamaño que la cepa salvaje. Por lo tanto, la complementación del gen *dam* no revirtió en su totalidad el fenotipo de las colonias de las mutantes *dam* (Fig. 3. 4 A). Por otro lado, se comprobó que estas mutantes *dam* son sensibles a 2-AMP y se observó que al complementarlas revierten dicho fenotipo (datos no mostrados).

## **2.2. Crecimiento en medio líquido**

Se analizó el crecimiento de las diferentes cepas (SSM2795, SSM2796, STD2795, STD2796, STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833) en medio líquido graficando curvas de masa celular (DO en función del tiempo) y viabilidad (UFC / ml en función del tiempo) (Fig. 3. 4 B). En estas curvas se puede observar que las cepas mutantes crecen en menor proporción que la cepa salvaje y que la viabilidad se encuentra afectada, sobre todo en la cepa STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833. A partir de estos dos gráficos se realizó una correlación directa entre UFC y DO (Curva de densidad bacteriana en función de la DO) (Fig. 3. 4 B). Esta curva fue empleada para estimar las suspensiones bacterianas a ser utilizadas en las infecciones celulares in vitro.

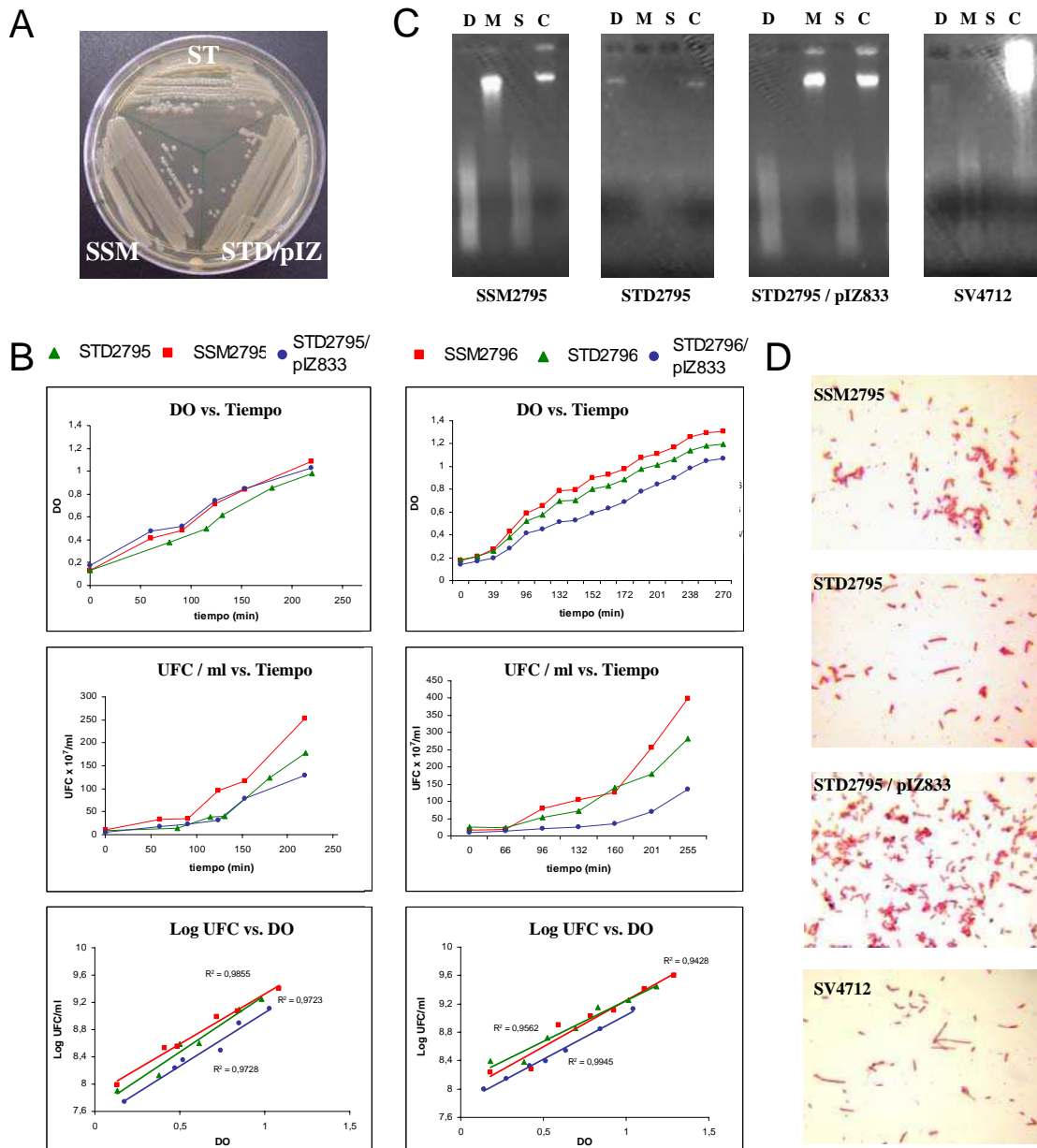
## **2.3. Estado de metilación del ADN de la mutantes *dam***

Se estudió el estado de metilación de las diferentes cepas mediante digestión diferencial como se describió anteriormente en el Capítulo 1. Se puede observar que el ADN de la cepa STD2795 no se encuentra metilado y que el patrón de metilación se revierte en la cepa complementada (Fig. 3. 4 C). Resultados similares se obtuvieron de las cepas SSM2796, STD 2796 y STD2796 / pIZ833 (datos no mostrados).

## **2.4. Morfología bacteriana**

Las cepas bacterianas se analizaron microscópicamente tanto en fresco (sin teñir) como luego de la tinción de Gram (Fig. 3. 4 D). Se observó que la mutante *dam* STD2795, a diferencia de la cepa salvaje, presenta una morfología filamentosa. Esta característica también se encuentra presente en la mutante dadora de la mutación *dam*, SV4712. Dicho cambio morfológico revirtió cuando se complementó con el gen salvaje. Cuando se analizaron las cepas SSM2796, STD2796 y sus complementadas se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).





**Figura 3. 4. Caracterización de las cepas.** A) **Morfología de las colonias de *S. Typhimurium*.** Las cepas SSM2795 (SSM), STD2795 (STD) y STD2795 / pIZ833 (STD / pIZ) se sembraron en una placa de TSA y se incubaron a 37 °C durante 18 hs. (B) **Curvas de DO vs. Tiempo; UFC / ml vs. Tiempo y Correlación Log UFC vs. DO de cepas mutantes STD2795, STD2795 / pIZ833 y salvaje SSM2795 (panel izquierdo) y de las cepas mutantes STD2796, STD2796 / pIZ833 y salvaje SSM2796 (panel derecho).** Las cepas se cultivaron en medio TSB a 37 °C en agitación y a distintos tiempos se midió la DO a 600 nm. Se tomó una alícuota de éstos para realizar el recuento celular. Para la correlación entre el Log de UFC / ml y DO se realizó una regresión lineal entre los puntos. Estos resultados son representativos de cinco muestras independientes. (C) **Estado de metilación.** El ADN bacteriano total se digirió con enzimas de restricción. *DpnI* (D) (digiere ADN metilado), *MboI* (M) (corta ADN no metilado) y *Sau3AI* (S) (digiere el ADN independientemente del estado de metilación), ADN control (C) (sin enzima de restricción). Como control negativo de metilación se incluyó a la mutante SV4712, que carece de la enzima Dam. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (D) **Morfología bacteriana.** Fotomicrografía de las cepas indicadas cultivadas en LB a 37 °C durante 120 min. Aumento: 1000 x.

## 2.5. Control de la inocuidad de la marcación con FLAG en las diferentes cepas generadas

Se analizó, en qué medida, el marcado de genes mediante la técnica de *epitope tagging* (Uzzau S. y col., 2001) modifica la virulencia de las cepas de *S. Typhimurium* generadas. Para ello, en primer lugar, se realizaron experimentos de invasión y proliferación utilizando un cultivo de células epiteliales HEp-2 y cepas salvajes de *S. Typhimurium* marcadas y no marcadas con el epítotope FLAG. Los resultados demuestran que no existen diferencias significativas en la invasividad ni en la proliferación entre las cepas salvajes marcadas (SSM2795 y SSM2795) y la no marcada (ATCC14028) (Tabla 3. 1). Al analizar la capacidad invasiva y de proliferación de las mutantes *dam* marcadas se observó una disminuida capacidad para invadir y proliferar respecto de la cepa salvaje (Tabla 3. 1). Conforme a estudios previos realizados en mutantes *dam* de *S. Typhimurium* (García del Portillo F. y col., 1999), observamos una menor capacidad de invasión en las cepas mutantes *dam* marcadas, STD2795 SopA-FLAG (40 %) y STD2796 SopB-FLAG (48 %) respecto de la cepa salvaje parental no marcada (ATCC14028). Sin embargo, a diferencia de lo observado con la digestión diferencial, la complementación de las cepas *dam* con el plásmido pIZ833, no logró restaurar la capacidad de invasión en ninguna de las dos cepas mutantes *dam* marcadas (Tabla 3. 1). Por el contrario, los resultados demuestran que dichas cepas complementadas presentan una baja tasa de invasión. La falta de complementación de las cepas STD2795 / pIZ833 y STD2795 / pIZ833 podría deberse a que, si bien el plásmido pIZ833 es de bajo número de copias, un exceso de proteína Dam puede originar una cepa sobreproductora de dicha proteína. Se sabe que la desregulación (sobreproducción o subproducción) de enzima Dam, genera cambios fenotípicos de las bacterias. Por otro lado, se detectó una menor capacidad de proliferación intracelular en las cepas *dam* marcadas, STD2795 SopA-FLAG (60 %) y STD2796 SopB-FLAG (58 %) con respecto a la cepa salvaje. En este caso, la complementación con el gen *dam* salvaje revirtió el efecto de la mutación.

**Tabla 3. 1. Invasión y proliferación de las cepas marcadas**

	Control*	Salvaje <sup>§</sup>	Salvaje <sup>¶</sup>	<i>dam</i>		<i>dam</i> / pIZ833	
		SopA-FLAG	SopB-FLAG	SopA-FLAG	SopB-FLAG	SopA-FLAG	SopB-FLAG
Invasión de HEp-2 (%)	100	103	100	40 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
Proliferación Intracelular en HEp-2 (%)	100	96	99	60 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	100	100

Las células HEp-2 se utilizaron para analizar la invasividad y proliferación a los 20 min. y 24 hs., respectivamente. Los valores de invasión y proliferación se expresan en porcentaje respecto de la cepa control sin marcar ATCC14028.

\* Cepa salvaje de *S. Typhimurium* sin marcar, ATCC14028.

§ Cepa salvaje de *S. Typhimurium* marcada SSM2795 (SopA-FLAG).

¶ Cepa salvaje de *S. Typhimurium* marcada SSM2796 (SopB-FLAG).

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  respecto de la cepa salvaje sin marcar de *S. Typhimurium*, ATCC14028.

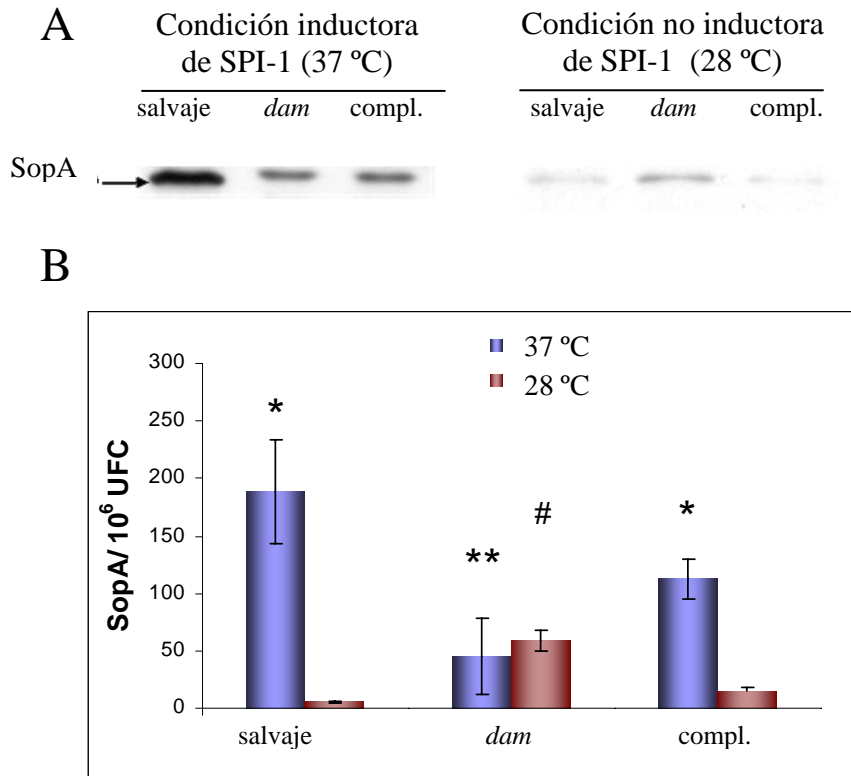
### Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las mutantes STD2795 y STD2796 de *S. Typhimurium* portan, respectivamente, las proteínas *sopA* y *sopB* marcadas con el epítipo FLAG y carecen de la proteína Dam. Consecuentemente, muestran características propias de la ausencia de dicha enzima, como ser: sensibilidad al análogo de base 2-AMP, viabilidad reducida respecto a la cepa salvaje, una morfología filamentosa y un patrón de metilación afectado. Podemos afirmar además, que el marcado de genes mediante la técnica de *epitope tagging* no afecta el fenotipo atenuado de las cepas *dam* de *S. Typhimurium* ni la virulencia de la cepa salvaje. En consecuencia, las cepas STD2795 y STD2796 son herramientas aptas para ser utilizadas en los próximos estudios.

### 3. Expresión de SopA y SopB, in vitro, en cepas de *S. Typhimurium* carentes de Dam

La expresión de los efectores proteicos SopA y SopB se analizó, in vitro, bajo condiciones de cultivo inductoras de la SPI-1 que imitan el ambiente intestinal (37 °C) y bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C). El análisis por *Western blot* reveló que la mutante *dam* de *S. Typhimurium* tiene una menor expresión de SopA cuando se cultiva en condiciones inductoras de la SPI-1 (Fig. 3. 5 A). La densitometría demostró una reducción significativa de la expresión de SopA a 37 °C en las mutantes *dam*

respecto de la cepa salvaje ( $p < 0,01$ ) y de la cepa complementada ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3. 2 B). Llamativamente, se encontró que SopA se sintetiza a niveles significativamente mayores ( $p < 0,001$ ) en la mutante *dam* comparada con la cepa salvaje, cuando se las cultiva en condiciones no inductoras de la SPI-1 (Fig. 3. 5 B).



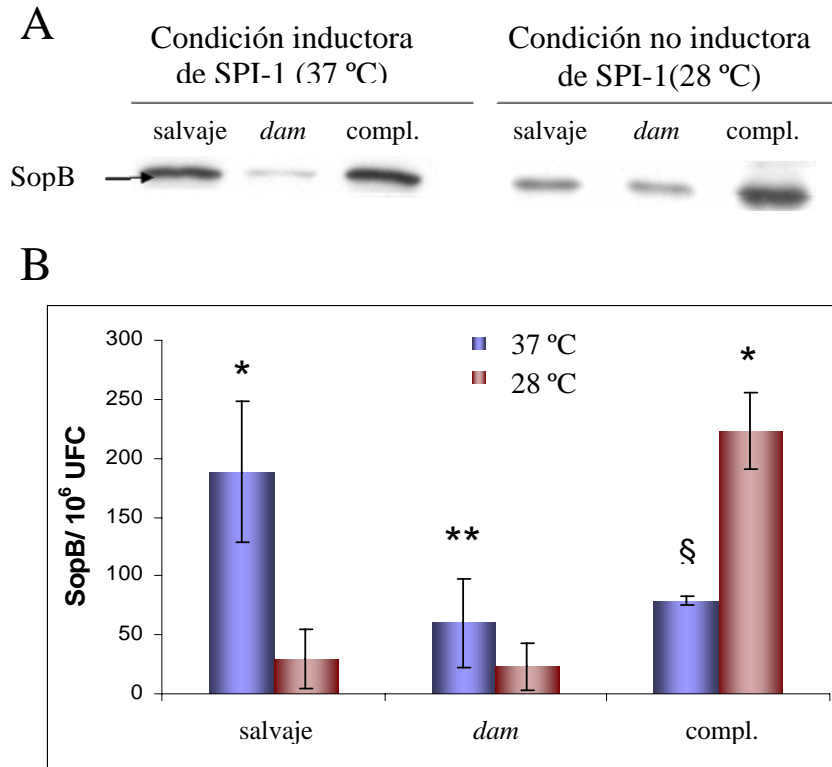
**Figura 3. 5. A) Expresión de SopA in vitro mediante Western blot.** Las cepas de *S. Typhimurium* SSM2795 (salvaje), STD2795 (*dam*) y STD2795 / pIZ833 (compl.) fueron cultivadas bajo condiciones inductoras (37 °C) o no inductoras (28 °C) de la SPI-1. Cada calle fue sembrada con material proveniente de  $10^7$  UFC aproximadamente. Las figuras muestran los resultados de un experimento representativo de seis experimentos independientes. **B) Análisis densitométrico de los niveles de efectores presentes en el pellet bacteriano.** La expresión de los efectores se normalizó a  $10^6$  UFC. Los datos representan la media  $\pm$  ES de seis experimentos diferentes. Análisis estadístico, prueba de ANOVA:

\*  $p < 0,05$  respecto de la misma cepa bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C).

\*\*  $p < 0,01$  respecto de la cepa salvaje y de la complementada bajo condiciones inductoras de la SPI-1 (37 °C).

#  $p < 0,001$  respecto de la cepa salvaje y de la complementada a 28 °C.

La expresión de SopB también se vio afectada en la mutante *dam* (Fig. 3. 6 A). Puede observarse una menor expresión ( $p < 0,05$ ) en las mutantes *dam* respecto de la cepa salvaje, bajo condiciones inductoras de la SPI-1 (Fig. 3. 6 B). Bajo condiciones no inductoras la expresión de SopB se redujo tanto en la mutante *dam* como en la cepa salvaje; los valores encontrados fueron similares (Fig. 3. 3 B).



**Figura 3. 6. A) Expresión de SopB in vitro mediante Western blot.** Las cepas de *S. Typhimurium* SSM2795 (salvaje), STD2795 (*dam*) y STD2795 / pIZ833 (compl.) fueron cultivadas bajo condiciones inductoras (37 °C) o no inductoras (28 °C) de la SPI-1. Cada calle fue sembrada con material proveniente de  $10^7$  UFC aproximadamente. Las figuras muestran los resultados de un experimento representativo de seis experimentos independientes. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de efectores presentes en el *pellet* bacteriano. La expresión de los efectores se normalizó a  $10^6$  UFC. Los datos representan la media  $\pm$  ES de seis experimentos diferentes. Análisis estadístico, prueba de ANOVA:

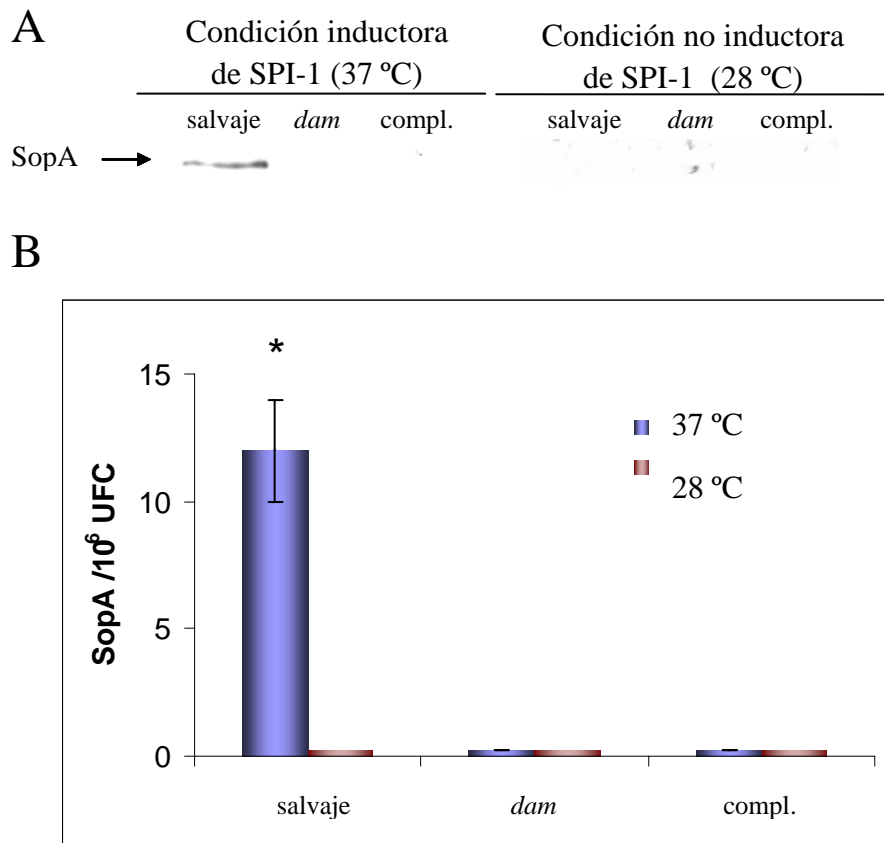
\*  $p < 0,01$  respecto de la cepa salvaje bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C).

§  $p < 0,001$  respecto de la cepa complementada bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C).

\*\*  $p < 0,05$  respecto de la cepa salvaje en condiciones inductoras de la SPI-1 (37 °C).

#### 4. Secreción de SopA y SopB, in vitro, por cepas de *S. Typhimurium* carentes de Dam

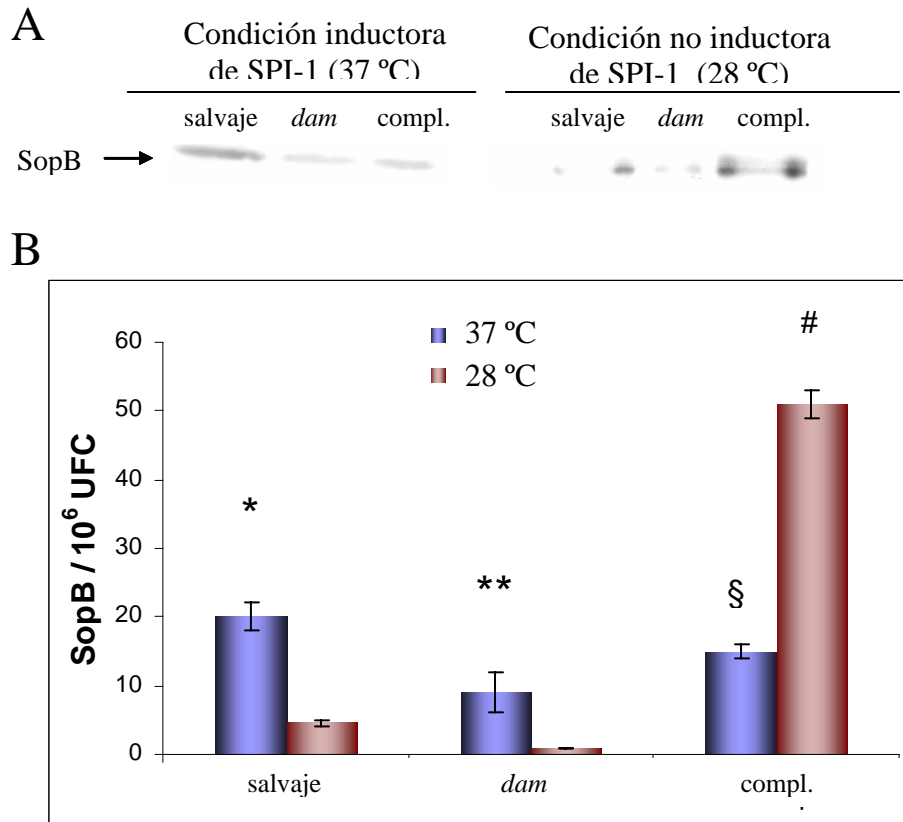
La secreción de SopA y SopB se analizó determinando la presencia de los efectores en los sobrenadantes de cultivo bacterianos. La Fig. 3. 7 muestra que la ausencia de Dam afecta notablemente la secreción de SopA. Independientemente de las condiciones de cultivo, la secreción de la proteína SopA no pudo ser evidenciada. El defecto en la secreción de SopA no logró revertirse en las cepas transformadas con el plásmido pIZ833. Por otro lado, para la cepa salvaje, la secreción de SopA sólo se observó bajo condiciones que imitan el ambiente intestinal (condiciones inductoras de la SPI-1).



**Figura 3. 7. A) Secreción de SopA in vitro mediante Western blot.** Las cepas de *S. Typhimurium* SSM2795 (salvaje), STD2795 (*dam*) y STD2795/pIZ833 (compl.) fueron cultivadas bajo condiciones inductoras (37 °C) y no inductoras (28 °C) de la SPI-1. Cada calle fue sembrada con material proveniente de 10<sup>7</sup> UFC aproximadamente. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de seis experimentos independientes. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de la proteína presentes en el sobrenadante bacteriano. La secreción de SopA se normalizó a 10<sup>6</sup> UFC. Los datos representan la media ± ES de seis experimentos diferentes.

\* p < 0,05 respecto de la cepa salvaje bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C) (Prueba *t* de Student).

La secreción de SopB también se vio afectada por la ausencia de Dam aunque, a diferencia de lo observado para SopA, pudieron cuantificarse los niveles secretados del efector. En la Fig. 3. 8 puede observarse que la mutante *dam* secreta niveles de SopB significativamente menores ( $p < 0,05$ ) respecto de la cepa salvaje, bajo condiciones inductoras de la SPI-1. Sólo la cepa complementada con el gen *dam* secretó SopB bajo ambas condiciones (Fig. 3. 8, A y B).



**Figura 3. 8. A) Análisis de la secreción de SopB in vitro mediante Western blot.** Las cepas de *S. Typhimurium* SSM2795 (salvaje), STD2795 (*dam*) y STD2795 / pIZ833 (compl.) fueron cultivadas bajo condiciones inductoras (37 °C) y no inductoras (28 °C) de la SPI-1. Cada calle fue sembrada con material proveniente de 10<sup>7</sup> UFC aproximadamente. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de seis experimentos independientes. **B) Análisis densitométrico de los niveles de la proteína presentes en el sobrenadante bacteriano.** La secreción de SopB se normalizó a 10<sup>6</sup> UFC. Los datos representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos diferentes. Análisis estadístico, prueba de ANOVA: \*  $p < 0,05$  respecto de la cepa salvaje bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C). §  $p < 0,001$  respecto de la cepa complementada bajo condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C). \*\*  $p < 0,05$  respecto de la cepa salvaje bajo condiciones inductoras de la SPI-1 (37 °C). #  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  respecto de la cepa salvaje y la mutante *dam* en condiciones no inductoras de la SPI-1 (28 °C).

## Conclusiones parciales

La ausencia de Dam afecta la expresión y secreción de SopA y SopB en *S. Typhimurium*. Las cepas *dam* expresan menores niveles de SopA bajo condiciones inductoras de la SPI-1, pero a su vez la sintetizan bajo condiciones no inductoras. No se evidenció la secreción de SopA en la mutante *dam*. En cuanto a SopB, las cepas *dam* expresan y secretan menores niveles de la proteína respecto de cepa salvaje, bajo condiciones inductoras de la SPI-1.

*Sobre la base de los resultados obtenidos, se decidió comenzar con el estudio de la expresión de los efectores de la SPI-1 en la mutante dam serovariedad Enteritidis SE $\Delta$ dam, mediante la técnica de PCR en tiempo real. A continuación se describen los experimentos realizados.*

## 5. Expresión de *sopA* y *sopB* en mutantes *dam* de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*

Los estudios se llevaron a cabo mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real utilizando la mutante SE $\Delta$ dam de *S. Enteritidis* (descrita antes) y la mutante LT2 $\Delta$ dam (obtenida por la misma técnica de mutagénesis que la utilizada para la cepa SE $\Delta$ dam). Las bacterias se cultivaron bajo condiciones inductoras de la SPI-1 y no inductoras, como se describió antes. Los resultados descritos en la Tabla 3. 2 confirman que en condiciones inductoras de la SPI-1, la mutante *dam* de *S. Typhimurium* presenta menor expresión de los genes *sopA* y *sopB* en comparación con la cepa parental (Expresión relativa:  $0,295 \pm 0,06$  y  $0,35 \pm 0,04$ ; respectivamente). Similarmente, en condiciones inductoras de la SPI-1, la mutante *dam* de *S. Enteritidis* mostró una menor expresión de los genes *sopA* (Expresión relativa:  $0,32 \pm 0,17$ ) y *sopB* (Expresión relativa:  $0,31 \pm 0,08$ ) en relación a la cepa salvaje (Tabla 3. 2).

En conjunto estos resultados muestran que la expresión de *sopA* y de *sopB* en las mutantes *dam* es aproximadamente un 30 % de lo expresado por las cepas salvajes. En otras palabras, la ausencia de Dam disminuye a 1/3 la expresión de *sopA* y de *sopB* tanto en *S. Enteritidis* como en *S. Typhimurium*.



**Tabla 3. 2. Transcripción génica de *sopA* y *sopB* en mutantes *dam*.**

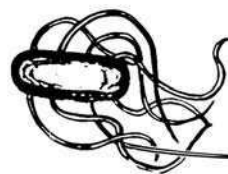
Gen	LT2 $\Delta$ <i>dam</i>			SE $\Delta$ <i>dam</i>		
	Expresión rel. <sup>a</sup> $\pm$ DS	% de expresión relativa	Variación <sup>b</sup>	Expresión rel. <sup>a</sup> $\pm$ DS	% de expresión relativa	Variación <sup>b</sup>
<i>sopA</i>	0,295 $\pm$ 0,06	29	↓3,39	0,32 $\pm$ 0,17	32	↓3,12
<i>sopB</i>	0,35 $\pm$ 0,04	35	↓2,86	0,31 $\pm$ 0,08	31	↓3,22

<sup>a</sup> Expresión relativa. La cantidad relativa de ARNm de la mutante SE $\Delta$ *dam* se determinó por RT-PCR a tiempo real, relativo a los niveles de ARNm de la cepa parental de *Salmonella*, establecido como 1, para las mismas condiciones de cultivo. Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar (DS). Estos datos corresponden a valores de media de tres experimentos independientes realizados en duplicado.

<sup>b</sup> Variación de la expresión comparada con la expresión relativa en la cepa parental de *Salmonella* para las mismas condiciones de cultivo.

### Conclusiones parciales

Pudimos demostrar la hipótesis planteada al comienzo del Capítulo 3. Utilizando diferentes metodologías comprobamos que la ausencia de Dam afecta la expresión de los genes *sopA* y *sopB* y las correspondientes proteínas efectoras en *Salmonella* spp. La disminución de la expresión génica de estos efectores fue similar en ambas serovariedades, Typhimurium y Enteritidis. La secreción de SopA y SopB también se afectó en ausencia de Dam. Los estudios, realizados en *S. Typhimurium*, mostraron que la secreción de SopA se inhibe totalmente en ausencia de Dam, mientras que la secreción de SopB por la mutante *dam* disminuyó significativamente respecto de la cepa salvaje.



*Discusión*

---

## Discusión

En principio, la participación de la proteína Dam como un factor de virulencia en la patogénesis bacteriana fue descrita para *E. coli* y más recientemente para *Salmonella enterica* (García del Portillo F. y col., 1999; Heithoff D.M. y col., 1999). Las mutantes de *S. enterica* que presentan una proteína Dam defectuosa, que carecen de ella o que la sobreexpresan, son atenuadas y generan una respuesta inmune protectora en distintos modelos animales (García del Portillo F. y col., 1999; Heithoff D.M. y col., 2001; Giacomodonato M.N. y col., 2004; Dueger E.L. y col., 2001). La falta de virulencia de estas mutantes podría ser un fenómeno multifactorial dado que el gen *dam* es un regulador global de genes. Una de las características de estas mutantes es su disminuida capacidad para invadir células epiteliales, lo cual podría correlacionarse con un defecto en la secreción de proteínas de invasión. En el presente capítulo se analizó la participación de la proteína Dam sobre la síntesis y secreción de dos efectores dependientes del SSTT-1: las proteínas SopA y SopB.

Como objetivo de este capítulo se propuso la construcción de mutantes *dam* de *S. Typhimurium* que portaren los genes que codifican para SopA y SopB marcados con el epítoto FLAG. El análisis exhaustivo de sendas mutantes demostró que las mismas, conservan las características fenotípicas de las cepas de *Salmonella* spp. carentes de la proteína Dam.

Los experimentos utilizando células epiteliales en cultivo confirmaron que las mutantes *dam* obtenidas muestran defectos en la invasión. De hecho, la tasa de invasión de las mutantes *dam* es aproximadamente la mitad de la mostrada por la cepa virulenta. Asimismo, los estudios de proliferación mostraron que las mutantes *dam* presentan afectada su capacidad de replicación intracelular, comparado con la cepa salvaje. Nuestros hallazgos indican que la metilación del ADN por la proteína Dam regularía no sólo mecanismos de invasión sino también de proliferación de la bacteria, *S. Typhimurium*, dentro de células no fagocíticas. Estos resultados concuerdan en algún punto con lo descrito por García del Portillo F. y col. (1999) quienes presentan a las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* como incapaces para invadir el epitelio intestinal murino y de causar citotoxicidad en las células M. Otros investigadores señalan que las

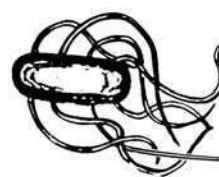
mutantes *dam* de *S. Typhimurium* exhiben una escasa colonización de las placas de Peyer y ganglios mesentéricos murinos (García del Portillo F. y col., 1999; Heithoff D.M. y col., 1999).

¿Por qué las mutantes *dam* muestran un defecto en la capacidad de invasión? Algunos autores sugieren que la metilación por Dam modularía el SSTT-1 (Badie G. y col., 2004; García del Portillo F. y col., 1999; Balbontin R. y col., 2006). De hecho, las mutantes de *S. Typhimurium* que carecen de la proteína Dam presentan una reducida secreción de ciertas proteínas de invasión codificadas por la SPI-1 como InvJ y SipC (García del Portillo F. y col., 1999; Pucciarelli M.G. y col., 2002; Balbontin R. y col., 2006). Nuestros resultados muestran claramente que la ausencia de Dam afecta la expresión de SopA y SopB. Específicamente en el caso de SopA, la falta de metilación por Dam “relajaría” las condiciones de expresión de este efector permitiendo su síntesis bajo un ambiente no permisivo. Y por otro lado, la carencia de Dam reduciría notablemente la secreción de SopA. Este hallazgo puede deberse a una falla en la secreción o ser una consecuencia de la disminuida síntesis de la proteína. De hecho, los niveles de SopA secretados por parte de la cepa salvaje de *S. Typhimurium* fueron relativamente bajos, por lo que sería probable entonces, que la cepa *dam* secrete SopA pero a niveles que están por debajo del límite de detección del método utilizado. Zhang Y. y col. (2005) demostraron que SopA posee una vida media corta en el citosol de las células eucariotas, ya que es rápidamente reconocida y degradada. Respecto de SopB, la mutante *dam* fue capaz de secretarla in vitro, aunque sólo en condiciones inductoras de la SPI-1 y con un nivel de secreción significativamente menor respecto al de la cepa salvaje. En conjunto, estos resultados indican que la metilación por Dam participaría en la regulación de la síntesis y secreción de SopA y SopB en *S. Typhimurium*.

Nuestros hallazgos coinciden con los obtenidos para *Yersinia pseudotuberculosis*, que posee un SSTT semejante al de *Salmonella enterica*. Se observó que la desregulación (sobreproducción) de la proteína Dam en *Yersinia pseudotuberculosis* genera una alteración en la síntesis de los efectores proteicos del SSTT (proteínas Yops) permitiendo su expresión y secreción bajo condiciones no permisivas (Badie G. y col., 2004; Falker S. y col., 2005 y 2006; Julio S.M. y col., 2001 y 2002).

En el año 2006, Balbontín y sus colaboradores identificaron grupos de genes que se encuentran activados o reprimidos en la mutantes *dam*, indicando que la metilación por

Dam reprime o activa su expresión. En el primer grupo se identificaron alrededor de 139 genes en *S. Typhimurium* tal como se observó para *E. coli* (Løbner-Olesen A. y col., 2003). Algunos ejemplos son los genes que codifican para las fimbrias *stdA stdB* y *stdC*, genes flagelares (*fliC* y *fliD*) y genes relacionados con quimiotaxis (*cheR*). Los miembros más relevantes del segundo grupo son *sipB*, *sipC*, *sipD*, *prgH* y *prgI*. Sobre la base de los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos sugerir que *sopA* y *sopB* pertenecen a esta segunda categoría de genes, en la cual la metilación por Dam se comporta como activadora.



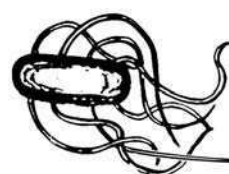
*Conclusiones*

---

## Conclusiones

Como se mencionó antes, la información sobre las mutantes *dam* de *S. Enteritidis* es limitada. Si bien parte de los experimentos planteados en este capítulo fueron realizados en la serovariedad Typhimurium, pudimos comenzar el análisis de la expresión de genes en la cepa SE $\Delta$ *dam* de *S. Enteritidis* mediante PCR a tiempo real.

Comprobamos que la ausencia de Dam disminuye a 1/3 la expresión de *sopA* y de *sopB* tanto en *S. Enteritidis* como en *S. Typhimurium*. Este hallazgo es importante porque sería la primera vez que se relaciona la atenuación conferida por la ausencia de Dam, con la regulación de factores de virulencia codificados fuera de la SPI-1. Cabe recordar que si bien la secreción de las proteínas SopA y SopB es dependiente de la SPI-1, tanto *sopA* como *sopB* están codificados por fuera de la isla.



*Materiales y  
 Métodos*

---



# Materiales y Métodos

## 1. Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas

Se utilizaron placas de agar de soja tripticase (TSA) para la propagación de las bacterias. Los cultivos en medio líquido se realizaron inoculando 10 ml de caldo Luria Bertani (LB) con una colonia proveniente de una placa fresca. Dichos cultivos se incubaron durante 16 hs, en un agitador de aire a 200 r.p.m. a la temperatura adecuada hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. La temperatura de incubación fue de 28 °C ó 37 °C según el experimento. En todos los casos, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml se determinó mediante siembra de diluciones apropiadas en placas de TSA con el antibiótico correspondiente. Las concentraciones de antibióticos que se utilizaron a lo largo de los experimentos fueron: Cloranfenicol (Cm) 25 µg / ml, Ampicilina (Amp) 100 µg / ml, Kanamicina (Km) 50 µg/ml y Gentamicina (Gm) 100 µg / ml.

## 2. Generación de cepas bacterianas con efectores marcados

Para la generación de la marcación de las proteínas efectoras, cepas virulentas de *S. Typhimurium* SSM2795 (SopA-FLAG) y SSM2796 (SopB-FLAG) con los efectores SopA y SopB marcados, respectivamente, fueron obtenidas a partir de un trabajo en colaboración con el Dr. Rubino (Uzzau S. y col., 2001). Estas cepas fueron utilizadas como aceptoras de la mutación *dam* ( $\Delta dam-230 zge-6313::Tn10dCm$ ) en una transducción, utilizando el bacteriófago P22HT, a partir de la mutante *dam* de *S. Typhimurium* SV4712 (cepa dadora) (provista por el Dr. Casadesús). De este modo, se obtuvieron las mutantes *dam* de *S. Typhimurium* denominadas STD2795 y STD2796 con los efectores SopA y SopB marcados con FLAG, respectivamente. Estas cepas se transformaron con el plásmido pIZ833, que porta el gen *dam* salvaje, tal como se detalla más adelante. Las características más relevantes de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla 3. 3.

**Tabla 3. 3. Características de las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en los experimentos.**

Cepa	Fenotipo	Genotipo	Referencia
<b>S. Typhimurium</b>			
ATCC14028	Salvaje	Salvaje	Dr. Uzzau
SSM2795	Salvaje	<i>sopA</i> ::3xFLAG Km <sup>R</sup>	Dr. Uzzau
SSM2796	Salvaje	<i>sopB</i> ::3xFLAG Km <sup>R</sup>	Dr. Uzzau
SV4712	Dam	$\Delta dam-230$ <i>zge-6313::tn10d</i> Cm <sup>R</sup> (ligado a <i>dam</i> ) <i>traB1</i> :: <i>MudJ</i> Km <sup>R</sup>	Dr. Casadesús
STD2795	Dam	$\Delta dam$ <i>sopA</i> ::3xFLAG Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Esta Tesis
STD2796	Dam	$\Delta dam$ <i>sopB</i> ::3xFLAG Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	Esta Tesis
STD2795 / pIZ833	STD2795 Complementada	$\Delta dam$ <i>sopA</i> ::3xFLAG / pIZ833 Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup>	Esta Tesis
STD2796 / pIZ833	STD2796 Complementada	$\Delta dam$ <i>sopB</i> ::3xFLAG / pIZ833 Km <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup>	Esta Tesis
SSM3213	Salvaje	<i>sopE2</i> ::3 x FLAG <i>sopA</i> ::3 xFLAG <i>cat</i> ::FLAG Km <sup>R</sup>	Dr. Uzzau
SSM3215	Salvaje	<i>sopB</i> ::3 x FLAG <i>cat</i> ::FLAG Km <sup>R</sup>	Dr. Uzzau
LT2	Salvaje	Salvaje	Cepario de nuestro laboratorio
LT2 $\Delta dam$	Dam	<i>dam</i>	Esta Tesis
<b>S. Enteritidis</b>			
<i>S. Enteritidis</i> #5694	Salvaje	Salvaje	Cepario de nuestro laboratorio
SE $\Delta dam$	Dam	<i>dam</i>	Esta Tesis
<b>E. coli</b>			
DH5- $\alpha$ /pIZ833	Sobreproductora de Dam	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> / pIZ833 Amp <sup>R</sup>	Esta Tesis
<b>Plásmido</b>			
pIZ833		Contiene el gen <i>dam</i> salvaje de <i>E. coli</i> Amp <sup>R</sup>	Dr. Casadesús

### **3. Técnica de transducción**

La técnica de transducción se realizó basándose en el método de Sambrook J. y col., (1989) como se describió en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1. En este caso, la diferencia radica en la utilización de la cepa bacteriana de *S. Typhimurium* SV4712 (mutante *dam*) como donante y de las cepas SSM2795 (SopA-FLAG) o SSM2796 (SopB-FLAG) como parentales. Dado que el transposón *Tn10d* presente en el fragmento de interés de la mutante SV4712 confiere resistencia a Cm, la selección de las cepas transductantes se realizó en placas de agar conteniendo este antibiótico. La incubación de las placas se realizó a 37 °C. Por último se procedió a la selección de la cepa de interés mediante la técnica de réplica en placa. Las mutantes *dam* son sensibles a 2-aminopurina (2-AMP) (Palmer B.R. y M.G. Marinus, 1994) pudiéndose determinar la sensibilidad a este análogo de base usando placas de TSA que contienen 100 µg de 2-AMP / ml. Por lo tanto, las colonias presentes en las placas de Cm se repicaron en forma secuencial en placas de 2-AMP, Km, Cm y TSA y se incubaron a 37 °C. Como control se repicaron en las mismas placas la cepa salvaje de *S. Typhimurium*, la cepa mutante SV4712 y la cepa receptora SSM 2795 ó SSM2796. Se seleccionaron aquellas mutantes que mostraron buen crecimiento en Cm, Km y TSA, y sensibilidad a 2-AMP y se conservaron a -80 °C para su posterior análisis y caracterización.

### **4. Extracción plasmídica**

La extracción plasmídica a partir de la cepa DH5- $\alpha$  / pIZ833 se realizó tal como se describió en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

### **5. Técnicas de transformación por electroporación**

Para la obtención de las cepas complementadas, esto es portadoras del plásmido pIZ833, se electroporaron las bacterias electrocompetentes como se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

#### **5. 1. Obtención de células electrocompetentes**

Se realizó un cultivo de la cepa mutante receptora STD2795 ó STD2796 en 10 ml de caldo LB con agitación por 18 hs. Se tomaron 500 µl del precultivo y se lo incubó con 10 ml de medio LB durante 1 h bajo agitación a 37 °C. Se centrifugó a 7.000 r.p.m. y 4 °C durante 10 minutos, previo enfriamiento en hielo durante 15 minutos. Se descartó el

sobrenadante y el *pellet*, fracción con bacterias, se resuspendió en 10 ml de agua miliQ (agua ultra pura). Luego se repitió la centrifugación y se resuspendió el *pellet* en 150  $\mu$ l de glicerol al 10 %. Se conservó la muestra a -80 °C.

## **5. 2. Ensayo de electroporación**

Los ensayos de transformación se realizaron tomando 40  $\mu$ l de células electrocompetentes los cuales se incubaron con 7  $\mu$ l (630 ng) de plásmido pIZ833 durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, esta mezcla se colocó en cubetas previamente enfriadas y se procedió a la electroporación en las siguientes condiciones: resistencia 200 ohms ( $\Omega$ ), capacitancia 2,5 faraday (F) y resistencia 1,25 kvolts (kv). Luego de la electroporación, las bacterias se recuperaron durante 3 hs a 37 °C con 800  $\mu$ l de medio SOC. Por último se sembraron 100 y 700  $\mu$ l en placas de agar TSA con Amp, de modo de seleccionar positivamente a las células que fueron transformadas con el plásmido pIZ833.

## **5. 3. Selección de la cepa complementada de *S. Typhimurium*, STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833**

La selección de la cepa de interés se realizó mediante la técnica de réplica en placa. Para ello, las colonias que desarrollaron en las placas de Amp fueron repicadas en forma secuencial en placas de TSA con Amp, Km, Cm y TSA sin antibiótico e incubadas a 37 °C. Como control se sembraron en las mismas placas la cepa salvaje, la cepa mutante SV4712, una cepa Amp resistente y las cepas receptoras STD2795 ó STD2796. Una vez seleccionadas, las cepas se conservaron a -80 °C para su posterior análisis y caracterización.

## **6. Conservación de cepas**

La conservación de las cepas obtenidas se realizó como se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

## **7. Caracterización fenotípica de cepas mutantes de *S. Typhimurium***

### **7. 1. Curvas de crecimiento bacteriano**

Se realizaron estudios básicos para establecer las características de crecimiento de las cepas salvajes SSM2795 y SSM2796, de las mutantes STD2795, STD2796 y STD2795 / pIZ833, STD2796 / pIZ833 de la misma forma que se describió en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1. El crecimiento bacteriano se analizó graficando los valores de densidad óptica (DO) vs. tiempo (t) y de UFC / ml vs. t. Se realizó además una correlación directa entre UFC y DO.

### **7. 2. Morfología bacteriana**

#### **7. 2. 1. Microscopía**

Las cepas bacterianas se analizaron microscópicamente tanto en fresco (sin teñir) como luego de la tinción de Gram (Britania). Se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss standard 25. Las imágenes se digitalizaron mediante una cámara digital y el software Zoom Browser EX.

#### **7. 2. 2. Crecimiento en placa**

Se estudió la morfología de las colonias analizando el tamaño, forma y color de las mismas. Para esto se cultivaron las cepas SSM2795, STD2795 y STD2795 / pIZ833 en una misma placa de TSA y las cepas SSM2796, STD2796 y STD2796 / pIZ833 en otra y se incubaron a 37 °C durante 24 hs.

### **7. 3. Estado de metilación del ADN de la mutantes *dam***

Se estudió el estado de metilación de las cepas salvaje, STD2795, STD2796, STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833 mediante digestión diferencial con las enzimas de restricción *Sau3AI*, *MboI* y *DpnI* como se describió en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1. Como control negativo de metilación se incluyó a la mutante SV4712, que carece totalmente de la proteína Dam.

## **8. Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Se utilizó la línea celular HEp-2 de epitelio laríngeo humano (ATCC, CCL-23) como prototipo de células no fagocíticas. Las monocapas celulares con un 80 % de confluencia fueron infectadas con las distintas cepas bacterianas tal como se detalla más adelante. La línea celular HEp-2 fue mantenida en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) suplementado con 100 µg / ml de Gm, a 37 °C y a una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Para cosechar las células se utilizó tripsina 0,25 %. Los subcultivos se realizaron 2 veces por semana, con una tasa de amplificación de 1:5.

## **9. Conservación de línea celular**

La conservación de la línea celular se realizó a partir de placas p100 al 100 % de confluencia. La monocapa celular se cosechó, centrifugó y resuspendió en medio de congelamiento (90 % SFB y 10 % de DMSO). Luego se transfirió a un criotubo manteniendo la muestra en hielo. Se procedió a un congelamiento lento, envolviendo primero los criotubos en papel y congelando por 24 hs. a -80 °C, y finalmente se los colocó en el tanque con nitrógeno líquido.

## **10. Invasión y proliferación de las mutantes *dam* en células HEp-2**

### **10. 1. Condiciones de cultivos para infección celular**

Las distintas cepas bacterianas se cultivaron en caldo LB hasta una DO de 0.6 a 600 nm, fase de crecimiento exponencial y luego los cultivos se diluyeron de modo de obtener una *m.o.i.* de 50:1. El inóculo bacteriano se preparó mediante dos centrifugaciones a 10.000 r.p.m. durante 10 min. El *pellet* se resuspendió en DMEM y se procedió a la infección de las células eucariotas. Una alícuota del cultivo fue reservada para el recuento de las UFC / ml mediante cultivo en placa.

### **10. 2. Infección de células HEp-2: Ensayo de protección a gentamicina**

Antes de iniciar la infección bacteriana, las placas p35 conteniendo a las células HEp-2 con un 80 % de confluencia se incubaron en medio DMEM con un 1 % de SFB, sin antibiótico durante 4 hs. a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Este procedimiento

permite sincronizar el estadio celular de las células y eliminar el contenido de gentamicina.

Se utilizaron 8 placas por ensayo, 4 para el análisis de la capacidad de invasión bacteriana y 4 para el estudio de la capacidad bacteriana de replicación intracelular. Para ello se utilizaron la cepa salvaje ATCC14028, las cepas SSM2795, STD2795, STD2795 / pIZ833 ó las cepas SSM2796, STD2796, STD2796 / pIZ833. Como control negativo se utilizó una placa no infectada. Para medir la capacidad invasiva de las bacterias, las células Hep-2 se infectaron con 0,5 ml del cultivo bacteriano por aproximadamente 20 min. Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con medio conteniendo antibiótico por 30 min. para eliminar a las bacterias extracelulares. A continuación se lavó el cultivo tres veces con PBS. Las bacterias intracelulares se obtuvieron incubando las células eucariotas con solución de lisis, según Uzzau S. y col. (2001). Posteriormente, se sembró en placa 0,1 ml de esa suspensión para realizar el recuento de las UFC / ml.

Para el estudio de la capacidad replicativa de las bacterias intracelulares, se repitió el protocolo anterior hasta el último lavado con PBS. Luego las células HEp-2 infectadas se incubaron durante 24 hs. en medio DMEM con 1 % de SFB y sin antibiótico (Uzzau S. y col., 2001). Las bacterias intracelulares se obtuvieron tratando las células eucariotas con solución de lisis. Se prosiguió sembrando en placa para obtener el recuento de las UFC / ml a las 24 hs. tal como se describió previamente.

De esta manera se obtuvieron dos recuentos, uno a los 20 min. indicando el número de bacterias que invadieron las células epiteliales y otro a las 24 hs., indicando su proliferación.

## **11. Análisis de la participación de la proteína Dam en la expresión y secreción de los efectores SopA y SopB in vitro**

### **11.1. Cultivos bacterianos**

Para este análisis se utilizaron las cepas salvajes de *S. Typhimurium* SSM2795 y SSM2796, las cepas *dam* STD2795 y STD2796 y las cepas complementadas STD2795 / pIZ833 y STD2796 / pIZ833. Estas fueron cultivadas bajo condiciones inductoras y no inductoras de la SPI-1 como se describe en el próximo punto.

## **11.2. Análisis de la expresión de proteínas**

Las cepas se cultivaron en 20 ml de medio LB 0,1 M NaCl sin agitación, durante toda la noche a 37 °C (condiciones inductoras de la SPI-1) y a 28 °C (condiciones no inductoras de la SPI-1) (Miki T. y col., 2004). Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4 °C y 10.000 r.p.m. durante 10 min. La extracción de las proteínas del *pellet* (bacterias y proteínas asociadas a las bacterias) se realizó mediante la técnica descrita por Raffatellu M. y col., (2005). Los *pellets* se resuspendieron en 200 µl de PBS 1X e inmediatamente se mezclaron con 100 µl de *buffer* muestra 4X. La muestra se conservó a -20 °C.

## **11.3. Análisis de la secreción de proteínas**

Las bacterias fueron incubadas durante 18 hs. en condiciones inductoras o no inductoras de la SPI-1 tal como se describió previamente. Luego los cultivos se colocaron en hielo durante 30 min. y se centrifugaron a 4 °C y 10.000 r.p.m. durante 15 min. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de un filtro Millipore de 0,45 µm de modo de eliminar las bacterias restantes. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con 25 % de ácido tricloroacético en hielo durante 1 h. Después de una centrifugación a 4 °C y 14.000 r.p.m. durante 30 min., los *pellets* se lavaron con 0,2 ml de NaOH 0,1 N y 1 ml de acetona helada y se colocaron a -20 °C durante 20 min. Finalmente, los precipitados se recogieron mediante una centrifugación de 15 min. a 4 °C y 14.000 r.p.m. Los sedimentos se dejaron secar durante 30 min., se resuspendieron en 30 µl de *buffer* muestra (Raffatellu M. y col., 2005) y se conservaron a -20 °C.

## **12. Detección y análisis de las proteínas marcadas con FLAG**

### **12.1. Western blot**

Para el análisis del contenido proteico, las muestras se incubaron 5-10 min. con 2,5 % de β-mercaptoetanol a 100 °C. Luego se sometieron a una electroforesis en un gel SDS-poliacrilamida al 10 %. Las proteínas se transfirieron a una membranas de PVDF y los efectores bacterianos marcados se detectaron mediante anticuerpos monoclonales anti FLAG conjugados con peroxidasa (Sigma, St Louis, MO) en una dilución 1/500 durante 1 h. a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo Luminol (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y placas



autorradiográficas BioMax™ Light-1 Film (Kodak) de acuerdo a las condiciones del fabricante.

## 12. 2. Cuantificación de los *Western blots*

Las autorradiografías se digitalizaron y la intensidad de las bandas se determinó utilizando el programa “NIH-image” disponible en la página web <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

## 13. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La extracción de ARNm con trizol y la técnica de RT-PCR cuantitativa a Tiempo Real se llevó a cabo como se describe en el Capítulo 4. Los *primers* utilizados para la detección de *sopA* y *sopB* se describen en la Tabla 3. 4..

**Tabla 3. 4. Oligonucleótidos usados para estudiar expresión génica.**

Gen Blanco	Primer <sup>a</sup>	Secuencia (5'→3')
<i>16s</i>	q-16s-F	GCCGCAAGGTAAAACCTCAA
	q-16s-R	AAGGCACCAATCCATCTCTG
<i>sopA</i>	q-sopA-F	TCCACCGTGAAGTTGATTGA
	q-sopA-R	GCACTGAGGATGTGCTGGTA
<i>sopB</i>	q-sopB-F	GGAATTGTAAAAGCGGCAAA
	q-sopB-R	TTTTCTGTCCACCGCTATCC

Los *primers* fueron obtenidos de Invitrogen Inc. y fueron diseñados de acuerdo a la información de secuencia de ADN disponible para la cepa *S. Enteritidis* (*Salmonella* spp. comparative sequencing blast server Blast Server Database from [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

<sup>a</sup> F, *primer forward*; R, *primer reverse*.

## 14. Estadística

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante prueba *t* de Student, y ANOVA. En la presentación de cada resultado se indica la prueba estadística utilizada.



*Referencias  
Bibliográficas*

---

## Referencias bibliográficas

- Altier, C.** 2005. Genetic and Environmental Control of *Salmonella* Invasion. *J Microbiol.* **43**: 85-92.
- Badie G., D. M. Heithoff y M. J. Mahan.** 2004. LcrV synthesis is altered by DNA adenine methylase overproduction in *Yersinia pseudotuberculosis* and is required to confer immunity in vaccinated hosts. *Infect. Immun.* **72(11)**: 6707-6710.
- Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang y C. A. Lee.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**: 703-714.
- Bakowski, M. A., J. T. Cirulis, N. F. Brown, B. B. Finlay y J. H. Brummell.** 2007. SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol.* **9(12)**:2839-2855.
- Bakshi, C. S., V. P. Singh, M. W. Wood, P. W. Jones, T. S. Wallis y E. E. Galyov.** 2000. Identification of SopE<sub>2</sub>, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* **182**: 2341-2344.
- Balbontin, R., G. Rowley, M. G. Pucciarelli J. Lopez-Garrido, Y. Wormstone, S. Lucchini, F. Garcia-Del Portillo, J. C. Hinton y J. Casadesús.** 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **188(23)**:8160-8168.
- Cheminay, C., A. Mohlenbrink y M. Hensel.** 2005. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* **174**:2892-2899.
- Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack y S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol.* **30**: 175-188.
- Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan y M. Hensel.** 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol.* **31**: 1759-1773.
- Drecktrah, D, L. A. Knodler, K. Galbraith y O. Steele-Mortimer.** 2005. The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol.* **7(1)**: 105-113.
- Dueger, E. L., J. K. House, D. M. Heithoff y M. J. Mahan.** 2001. Salmonella DNA adenine methylase mutants elicit protective immune responses to homologous and heterologous serovars in chickens. *Infect Immun.* **69(12)**: 7950-7954.
- Fälker, S., M. A. Schmidt y G. Heusipp.** 2006. Altered Ca<sup>2+</sup> regulation of Yop secretion in *Yersinia enterocolitica* after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG. *J Bacteriol.* **188(20)**:7072-81.
- Falker, S., M. A. Schmidt y G. Heusipp.** 2005. DNA methylation in *Yersinia enterocolitica*: role of the DNA adenine methyltransferase in mismatch repair and regulation of virulence factors. *Microbiology.* **151**: 2291-2299.
- Feng, Y., S. R. Wentz y P. W. Majerus.** 2001. Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(3)**:875-9.
- Fu, Y. y J. E. Galán.** 1998. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol.* **27**: 359-368.

- Galán, J. E.** 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* **17**: 53-86.
- Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges y T. S. Wallis.** 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol.* **25(5)**: 903-912.
- García del Portillo, F., M. G. Pucciarelli y J. Casadesús.** 1999. DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella typhimurium* Show Defects In Protein Secretion, Cell Invasion, And M Cell Cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 11578-11583.
- Giacomodonato, M. N., M. H. Sarnacki, R. L. Caccuri, D. O. Sordelli y M. C. Cerquetti.** 2004. Host response to a *dam* mutant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a temperature sensitive phenotype. *Infect.Immun.* **72**, 5498–5501.
- Hansen-Wester, I. y M. Hensel.** 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**: 549–559.
- Hardt, W. D. y J. E. Galán.** 1997. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 9887-9892.
- Heithoff, D. M., E. Y. Enioutina, R. A. Daynes, R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan.** 2001. *Salmonella* DNA Adenine Methylase Mutants Confer Cross-Protective Immunity. *Infect Immun.* **69(11)**: 6725–6730.
- Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan.** 1999 An Essential Role for DNA Adenine Methylation In Bacterial Virulence. *Science.* **284**: 967-70.
- Hentschel, U. y J. Hacker.** 2001. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect.* **3**: 545–548.
- Hernandez, L. D., K. Hueffer, M. R. Wenk y J. E. Galán.** 2004. *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science.* **304(5678)**:1805-7.
- Jones, B. D. y S. Falkow .** 1994. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun.* **62**: 3745-3752.
- Julio, S. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, E. K. Karl, R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan.** 2001. DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* **69(12)**: 7610–7615.
- Julio, S. M., D. M. Heithoff, R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan.** 2002. DNA adenine methylase overproduction in *Yersinia pseudotuberculosis* alters YopE expression and secretion and host immune responses to infection. *Infect Immun.* **70**: 1006-1009.
- Kaniga, K, D. T rollinger y J. E. Galán.** 1995<sup>a</sup>. Identification of two targets of the type III secretion system encoded in *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that share homology to IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol.* **177**: 7078-7085.
- Kaniga, K, S. Tucker, D. Trollinger y J. E. Galán.** 1995<sup>b</sup>. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol.* **177**: 3965-3971.
- Kubori, T., A. Sukhan, J. Wilson y J. E. Galán.** 2001. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol.* **183(4)**: 1159-1167.

- Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa y J. E. Galán.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(18)**:10225-30.
- Kuhle, V. y M. Hensel.** 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci.* **61**:2812-2826.
- Layton, A. N., P. J. Brown, E. Edouard y E. E. Galyov.** 2005. The *Salmonella* translocated effector SopA is targeted to the mitochondria of infected cells. *J. Bacteriol.* **187(10)**: 3565–3571.
- Lee, A. K., C. S. Detweiler y S. Falkow.** 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**: 771-781.
- Løbner-Olesen, A., M. G. Marinus y F. G. Hanssen.** 2003. Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4672–4677.
- López-Garrido, J. y J. Casadesús.** 2010 Regulation of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) by DNA Adenine Methylation. *Genetics.* . [Epub ahead of print]PMID: 20008574 [PubMed - as supplied by publisher].
- Mallo, G. V., M. Espina, A. C. Smith, M. R. Terebiznik, A. Alemán, B. B. Finlay, L. E. Rameh, S. Grinstein y J. H. Brumell.** 2008. SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol.* **25**, 741-52.
- Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer y B.B. Finlay.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* **2**: 145–156.
- Miao, E. A., J. A. Freeman y S. I. Miller.** 2002. Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *J Bacteriol.* **184**: 1493-1497.
- Miki, T., N. Okada y H. Danbara.** 2004. Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *J. Biol. Chem.* **279(33)**:34631-42.
- Palmer, B. R. y M. G. Marinus.** 1994. The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene.* **143(1)**:1-12.
- Patel J. C. y J. E. Galán.** 2005. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* — all in the name of entry. *Curr Opin in Microbiol.* **8**:10-15.
- Patel, J. C. y J. E. Galán.** 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol.* **175**, 453-463.
- Patel, J. C., K. Hueffer, T. T. Lam. y J. E. Galán.** 2009. Diversification of a *Salmonella* virulence protein function by ubiquitin-dependent differential localization. *Cell.* **17**, 283-94.
- Pucciarelli, M. G., A. I. Prieto, J. Casadesús y F. García-Del Portillo.** 2002. Envelope Instability In DNA Adenine Methylase Mutants Of *Salmonella enterica*. *Microbiology.* **148**: 1171-1182.
- Raffatellu, M., R. P. Wilson, D. Chessa, H. Andrews-Polymenis, Q. T. Tran, S. Lawhon, S. khare, L. G. Adams y A. J. Bäumlér.** 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE<sub>2</sub> contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* **73**: 146–154.
- Russell, D. A., J. S. Dooley y R. W. Haylock.** 2004. The steadystate *orgA* specific mRNA levels in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by

oxygen during logarithmic growth phase but not early-stationary phase. *FEMS Microbiol Lett.* **236**: 65-72.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis**, 1989.. Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Schlumberger, M. C. y W. D. Hardt**. 2006. *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr. Opin. Microbiol.* **(1)**:46-54. Review.
- Stender, S, A. Friebel, S. Linder, M. Rohde, S. Miold y W. D. Hardt**. 2000. Identification of SopE<sub>2</sub> from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol.* **36**: 1206-1221.
- Uchiya, K. y T. Nikai**. 2005. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent expression of suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages. *Infect Immun.* **73(9)**: 5587–5594.
- Uzzau, S., N. Figueroa-Bossi, S. Rubino y L. Bossi**. 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **26**: 15264-9.
- Vernikos, G. S. y J. Parkhill**. 2006 Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics.* **22(18)**:2196-203.
- Wallis, T. S. y E. E. Galyov**. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* **36(5)**: 997- 1005.
- Waterman, S. R., y D. W. Holden**. 2003. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5(8)**: 501–511.
- Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, A. M. Siber, B. A. McCormick, S. Hedges, R. Rosqvist, T. S. Wallis y E. E. Galyov**. 2000. The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol.* **2**: 293-303.
- Zhang, S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsolis, L. G. Adams y A. J. Bäumlér**. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* seotype typhimurium- induced diarrhea. *Infect Immun.* **71(1)**:1-12. Review.
- Zhang, S., R. L. Santos, M. Tsolis, S. Stender, W-D. Hardt, A. J. Baumler, y L. G. Adams**. 2002. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE<sub>2</sub> act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun.* **70**: 3843-3855.
- Zhang, Y., W. M. Higashide, B. A. McCormick, J. Chen y D. Zhou**. 2006. The inflammation-associated *Salmonella* SopA is a HECT-like E3 ubiquitin ligase. *Mol Microbiol.* **62(3)**:786-93.
- Zhang, Y., W. Higashide, S. Dai, D. M. Sherman y D. Zhou**. 2005. Recognition and ubiquitination of *Salmonella* type III effector SopA by a ubiquitin E3 ligase, HsRMA1. *J Biol Chem.* **280(46)**:38682-8.
- Zhou, D. y J. Galán**. 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* **3**: 1293-1298.

## **CAPITULO 4**

**¿La enzima Dam regula la síntesis del LPS?**

## Hechos e interrogantes que dieron origen al Capítulo 4

### Hechos

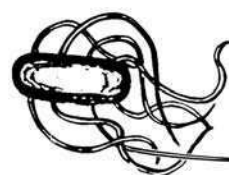
- ✓ Las cepas de *S. Typhimurium* que carecen completamente de la proteína Dam muestran una alta sensibilidad a detergentes orgánicos, hecho que se asocia a defectos en la estabilidad de la membrana. De igual modo, la mutante SD1 de *S. Enteritidis* (descrita en el capítulo 1) es altamente sensible al deoxicolato (datos no mostrados).
  
- ✓ El LPS contribuye a la estabilidad de membrana. Tanto el lípido A como el core oligosacárido, aumentan la estabilidad de la membrana externa a través de interacciones con metales catiónicos divalentes formando un entramado hidrofóbico relativamente impermeable a moléculas hidrofóbicas y proveyendo protección adicional contra antibióticos, colorantes, detergentes y sales biliares y otras moléculas tóxicas del tracto gastrointestinal.
  
- ✓ Como se describió en el capítulo 2, la mutante *SE $\Delta$ dam* induce una menor respuesta inflamatoria en macrófagos en cultivo.
  
- ✓ Las mutantes SD1 y *SE $\Delta$ dam* muestran defectos en la aglutinación frente al antisuero O9 (anticuerpos dirigidos contra el Antígeno O9).
  
- ✓ La mutante *SE $\Delta$ dam* presenta alteraciones en el LPS, más precisamente a nivel del largo de cadena del antígeno somático O.



## Interrogantes

¿La metilación por Dam regula la síntesis del antígeno O en *S. Enteritidis*?

Los hechos sugieren que las mutantes *dam* presentan alteraciones en el LPS. Si bien algunos de ellos podrían sugerir una alteración del lípido A (la menor respuesta inflamatoria inducida en macrófagos y la inestabilidad de la membrana) el defecto en la aglutinación y en el patrón del LPS indican fuertemente que la síntesis, en particular la polimerización, del antígeno O está afectado por la ausencia de Dam



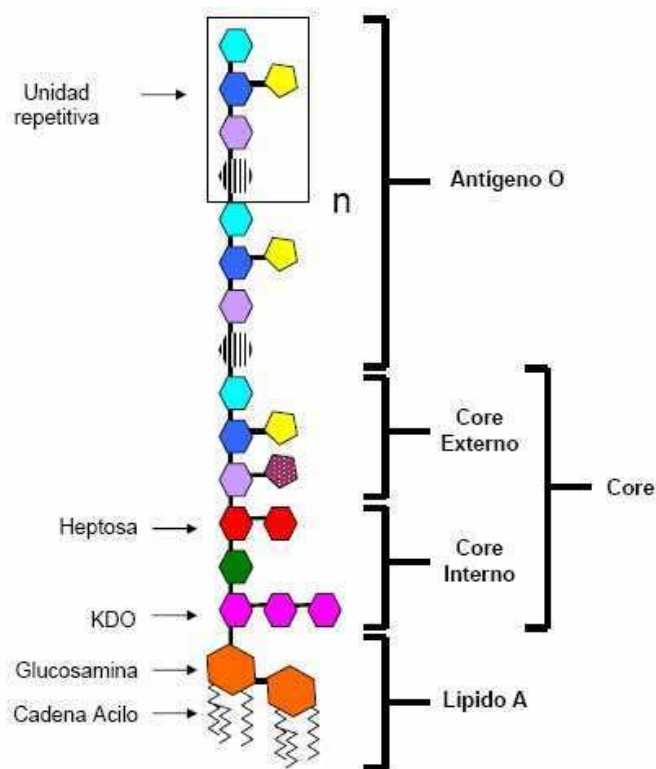
## *Introducción*

---

# Introducción

## El Lipopolisacárido y su estructura

El lipopolisacárido (LPS) es un componente clave de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que contribuye a la estabilidad y propiedades de barrera de permeabilidad de esta membrana. El LPS es una macromolécula glicolipídica compleja localizada en la capa externa de la membrana externa, la cual se la puede subdividir en tres dominios; (I) el lípido A, (II) una unidad oligosacárida core o núcleo y (III) el antígeno O u oligosacárido específico O, un polisacárido que consiste en unidades repetidas de tres a seis azúcares que se extienden desde la superficie celular y que está unido a la porción externa del oligosacárido core (Fig. 4. 1) (Raetz C.R. y C. Whitfield, 2002).



**Figura 4. 1. Esquema de la estructura del lipopolisacárido.** El LPS consiste en tres regiones (I) el lípido A; (II) el oligosacárido core o núcleo, el cual se lo subdivide en core interno y externo; y en algunas bacterias (III) el polisacárido específico O ó antígeno O.

KDO, ácido 3-deoxi-D-manno-octulosónico; n, número de unidad(es) repetitivas específica de cada serovariedad.

Cada dominio tiene propiedades estructurales y funcionales distintivas.

La molécula del lípido A, responsable de la endotoxina del LPS, es la porción más hidrofóbica del LPS, y consiste en azúcares, dos residuos de glucosamina y ácidos grasos. El LPS se mantiene anclado a la membrana gracias al lípido A y de esta porción, se extiende el oligosacárido core, que es una parte funcionalmente importante del LPS (Hornef M.W. y col., 2002; Raetz C.R. y C. Whitfield, 2002).

El core se divide en dos regiones, el core interno (proximal al lípido A) y el core externo (proximal al polisacárido O). Usualmente, la región del core no muestra gran variabilidad estructural dentro de géneros y especies bacterianas (por ejemplo, en *E. coli* hay sólo cinco tipos de core interno y en *Salmonella enterica* sólo dos). Típicamente el core interno consiste en tres residuos de ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico o 3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO) y de dos a tres residuos de L-glicero-D-mano-heptosa (Raetz C.R., 1996). Esta sección del core es altamente conservada entre géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y en particular el KDO se requiere para la viabilidad de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Unido al core interno, se encuentra el core externo estructuralmente más diverso, compuesto por hexosas. Esta región estaría más expuesta a la presión selectiva de la respuesta del hospedador, bacteriófagos y estrés ambiental (Erridge C. y col., 2002). El núcleo del LPS no se considera un factor de virulencia en si mismo, aunque algunos estudios han descrito su relación con la adhesión de ciertas bacterias a células del hospedador (Jacques M., 1996) y con un aumento de la actividad biológica de la endotoxina (Lüderitz T. y col., 1989).

El antígeno O es una cadena polisacárida compuesta de cuarenta o más unidades oligosacáridas repetidas, las cuales están covalentemente unidas al oligosacárido core. A diferencia del lípido A y del oligosacárido core, el antígeno O otorga variabilidad estructural al LPS. El antígeno O provee una alta diversidad inmunoquímica que es la base de la tipificación serológica (especificidad serológica), debido a la variación del tipo de azúcares, formación de ramificaciones, estereoquímica de las uniones O glicosídicas, en la presencia o la ausencia de sustituyentes no glicosídicos y modificaciones de azúcares. Además, estas subunidades pueden estar formadas por un sólo tipo de azúcar (formando homopolisacáridos) o por varios (formando heteropolisacáridos), y pueden ser lineales o ramificadas. Asimismo, las sustituciones no estequiométricas y otras modificaciones juegan un importante papel en la

antigenicidad de la cadena lateral O, de forma que adiciones de grupos acetyl o de residuos de glucosa y modificaciones de los enlaces entre residuos pueden variar el serotipo de la bacteria. En muchos casos, estas modificaciones están ligadas a la presencia de bacteriófagos lisogénicos o crípticos que codifican para enzimas que alteran la biosíntesis del antígeno O (Schnaitman C.A. y J.D. Klena, 1993). Por ejemplo existen más de 170 serotipos O diferentes en *E. coli* (Raetz C.R., 1996) y en *S. enterica* existen 46 serogrupos, pero junto con las modificaciones de las estructuras de la unidad repetitiva O basal, se crean muchos “factores O” adicionales. De hecho, en *Salmonella* para identificar los antígenos O, se hace una prueba con anticuerpos contra los grupos O1 (A) al O67 (luego se prueba el anticuerpo Vi para antígeno capsular, y por último se incluyen los anticuerpos contra los antígenos flagelares H) (Farmer, 2003; Brooks y col., 2000; Forbes y col., 1998; Jawetz y col., 2005; Smith y col., 1952).

## **Funciones del LPS**

Cada porción del LPS otorga a la membrana externa propiedades únicas.

La cadena de ácidos grasos unida al lípido A disminuye la fluidez de la membrana debido a que le provee un alto grado de “empaquetamiento lipídico” a la bicapa y al combinarse con una sola “cabeza polar”, la bicapa crea una barrera formidable contra moléculas hidrofóbicas (Whitfield C., 1995; Nikaido H., 1994). El residuo aniónico fosfato y los azúcares acídicos del lípido A o del core respectivamente, aumentan la estabilidad de la membrana externa a través de interacciones con metales catiónicos divalentes tales como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . Estas interacciones forman un entramado hidrofóbico relativamente impermeable a moléculas hidrofóbicas, proveyendo protección adicional contra antibióticos, colorantes, detergentes y sales biliares y otras moléculas tóxicas del tracto gastrointestinal (Coughlin R.T. y col., 1983).

La localización del polisacárido O en la superficie celular lo coloca en la interface entre la bacteria y su medio ambiente. El antígeno O provee otra capa de protección, que enmascara los epítopes del core antigénicamente conservado y receptores para bacteriófagos, aunque algunos bacteriófagos usan el antígeno O como sus receptores. El polisacárido O posee un papel esencial como determinante de virulencia y por lo tanto con una potencial aplicación en el desarrollo de vacunas. Su papel primordial pareciera estar involucrado en la protección. El polisacárido O podría contribuir a la evasión bacteriana de la respuesta inmune, aumentando la virulencia particularmente al

aumentar la resistencia de las bacterias ante la muerte mediada por el sistema de complemento (Raetz C.R., 1996). La activación de la cascada de complemento involucra una serie de reacciones proteolíticas altamente reguladas que facilitan la lisis bacteriana, depuración antigénica y generación de una respuesta inflamatoria. La unión del componente C3 del complemento con el antígeno O causa la formación de la unión del complejo de ataque de membrana C5b-9 en forma débil. Este complejo unido al antígeno O presenta un impedimento estérico para su integración y posterior disrupción de la membrana externa bacteriana (Joiner K.A., 1988). El ensamblado del complejo de ataque de membrana, se ve afectado por la química del polisacárido O, su largo de cadena (Burns S.M. y S.I. Hull, 1998) y la cantidad relativa del largo de la cadena de LPS suave (*smooth* o S-LPS) (Joiner K.A., 1988). El largo de cadena también afecta la sensibilidad en *E. coli* ante la acción bactericida de neutrófilos / proteína que aumenta la permeabilidad (BPI) (Weiss J. y col., 1986). En *V. cholerae*, las mutantes de LPS rugoso (*rough* R-LPS), tienen una incapacidad para colonizar el epitelio intestinal, hecho reflejado en su alta sensibilidad al complemento y péptidos catiónicos (Nesper J. y col., 2001). En las especies de *Salmonella*, el largo del antígeno O contribuye a una barrera efectiva (Murata T. y col., 2007) y afecta características clave de virulencia como la resistencia al suero y la entrada a células eucariotas (Grossman N. y col., 1987; Hoare A. y col., 2006; Murray G.L. y col., 2003; 2005; 2006). Más aún, el largo del antígeno O puede también regular la inmunidad adquirida. De hecho, Phalipon A. y col. (2006) han demostrado en *Shigella flexneri* que la inducción de una respuesta humoral específica contra antígeno O depende del largo de cadena del polisacárido. La presencia y el largo de cadena del polisacárido O en *Shigella flexneri* también es esencial para la invasividad y subsecuente distribución inter e intracelular (Van den Bosch L. y col., 1997; Sandlin R.C. y col., 1995 y 1996) debido a que el S-LPS influye en la localización polar de la proteína de invasión (IcsA). El papel que juega el polisacárido O en diferentes especies bacterianas es variable y está potencialmente magnificado en aquellas que pueden producir más de un lípido A-core unido al polímero.

El LPS puede provocar un gran espectro de actividades biológicas en células eucariotas, resultando en la producción y liberación de un amplio rango de mediadores inflamatorios del sistema inmune innato incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . El LPS unido a proteínas solubles CD14 y a proteínas de unión al LPS, es trasladado al complejo TLR-4, y/o al complejo receptor MD2 localizados en la superficie de los macrófagos

monocíticos, células polimorfonucleares, células endoteliales y linfocitos T (Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002; Erridge C. y col., 2002). El LPS, unido a la superficie bacteriana o liberado de la membrana durante el crecimiento, puede causar una profunda desregulación del sistema inmune, con el potencial de causar una reacción sistémica inflamatoria desregulada, falla multiorgánica, *shock* y muerte, conocido como síndrome de *shock* séptico (Beutler B. y E.T. Rietschel, 2003).

## **Biosíntesis del LPS**

La biogénesis del LPS es un proceso complejo que involucra varios pasos que ocurren en la membrana plasmática seguido de una translocación de las moléculas de LPS a la membrana externa (Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002; Raetz C.R.H. y col., 2007;; Valdano M.A., 2003). El core oligosacárido es ensamblado al lípido A preformado por una transferencia secuencial glicosil de monosacáridos en la cara citoplasmática de la membrana interna, Por otro lado, el antígeno O es ensamblado en forma independiente sobre un transportador lipídico denominado undecaprenil fosfato (und-P) en la cara interna de la membrana plasmática seguido de una serie de glicosiltransferasas (Whitfield C. y M.A. Valvano, 1993). Luego, estos caminos convergen por la unión covalente del antígeno O al dominio del core externo del aceptor oligosacárido core-lípido A en la cara periplásmica de la membrana interna (Heinrichs D.E. y col., 1998a; 1998b; Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002; Raetz C.R.H. y col., 2007; Valvano M.A., 2003; Whitfield C. y M.A. Valvano, 1993; Whitfield C., 1995). Por lo tanto el mecanismo de biosíntesis debe incluir un sistema de exporte que transporte al antígeno O sintetizado hacia el periplasma (McGrath B.C. y M.J. Osborn, 1991). Las tres rutas conocidas hasta ahora para la biosíntesis del antígeno O se distinguen por sus respectivos mecanismos de exporte y se denominan: Wzy-dependiente, transportador *cassette* de unión a ATP (ABC)-dependiente y, con una distribución mucho más limitada, sintasa-dependiente. A pesar de sus diferencias en el sistema de exporte, las tres vías poseen similares reacciones de iniciación y se completan con el mismo proceso de ligación del antígeno O al lípido A-core mediante la enzima WaaL (Whitfield C. y col., 1997; Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002; Valvano M.A., 2003; Marino P.A. y col., 1991; McGrath B.C. y M.J. Osborn, 1991; Mulford C. A. y M. J. Osborn, 1983).

Dado el tema central que nos atañe, desarrollaremos sólo el mecanismo Wzy-dependiente.

En el sistema Wzy-dependiente (Fig. 4. 2), exclusivo de heteropolisacáridos a menudo ramificados, la síntesis comienza con la unión de un primer residuo glucídico al und-P gracias a una galactosil-transferasa, WbaP, o a una N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, WecA. Una vez producida esta iniciación, el proceso continúa con la adición secuencial de los diferentes monosacáridos que constituirán una subunidad O. Estas reacciones se producen en el citoplasma y son catalizadas por diferentes transferasas, específicas para cada azúcar y tipo de enlace glicosídico, que actúan en la cara citoplasmática de la membrana interna.

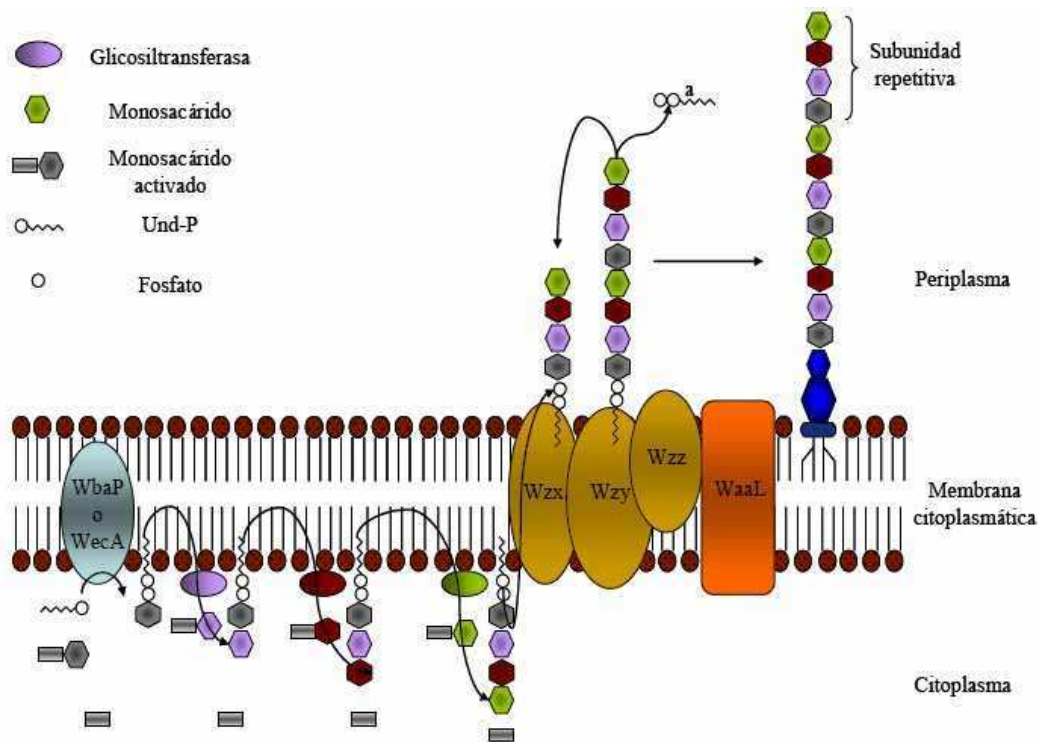
Cada subunidad ensamblada será translocada hacia el lugar de polimerización, en la cara periplasmática, por una proteína transmembrana con función flipasa denominada Wzx (mecanismo independiente de la hidrólisis de ATP) (Lesse A.J. y col., 1990; Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002; Rick P.D. y col., 2003; Valdano M.A., 2003). El mecanismo exacto de transporte de las subunidades a través de la bicapa lipídica aún se desconoce. Una vez en el periplasma, las subunidades unidas al und-P polimerizan mediante la transferencia del polímero en formación desde su und-P hasta el extremo de la nueva subunidad O. El efecto final es que el crecimiento se produce por el extremo reducido del polímero en formación. Esta polimerización está catalizada por la polisacárido-O polimerasa, Wzy (Collins L.V. y J. Hackett, 1991), que es, al igual que Wzx, una proteína hidrofóbica con múltiples dominios transmembrana. Mutantes en esta proteína producen un tipo de LPS conocido como S-R (*semi-rough*), con una única subunidad O unida al núcleo. El und-PP liberado en cada reacción de polimerización, dada su utilización intensiva, es reciclado mediante una reacción de defosforilación.

El componente final característico de la vía Wzy-dependiente es la proteína Wzz, que genera la distribución modal de la longitud de las cadenas polisacáridicas específica de cada cepa, la cual queda reflejada en el patrón de bandas característico en electroforesis en geles de poliacrilamida (Whitfield C., y col., 1997).

En *S. Typhimurium*, la distribución bimodal del número de subunidades de antígeno O unidas al lípido A-core, es determinada por dos proteínas: Wzz (conocida también como Cld o Rol), que media la producción de un antígeno O de entre 16 a 35 subunidades (largo o tipo-L) (Morona R. y col., 1995; Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002); y Wzz<sub>FepE</sub>, que es responsable de generar un LPS con más de 100 subunidades O (muy largo o tipo-VL) (Murray G.L. y col., 2003). Se ha demostrado que el LPS de



*Salmonella* se modifica durante la vida intracelular, por ejemplo con respecto al lípido A (Guo, L. y col., 1997; Ernst, R. K., y col., 2001) y con el número de unidades repetitivas del antígeno O (Firdich, E., 2003; Lahteenmaki, K., 2005; Murray, G. L., 2003)



**Figura 4. 2. Esquema del sistema de biosíntesis del antígeno O Wzy-dependiente.** Las subunidades son exportadas al periplasma por separado, gracias a la proteína Wzx. Una vez allí, la proteína Wzy media la polimerización de éstas, uniendo el polímero en formación a la subunidad recién exportada. Así, el crecimiento del antígeno O se produce en su extremo reducido. Cada subunidad polimerizada supone la liberación de una molécula de und-PP (a), que debe ser reciclada a la forma und-P para su reutilización en la síntesis de nuevas subunidades

El mecanismo por el cual se produce la regulación de la distribución modal de la longitud de las cadenas polisacáridicas es desconocido, aunque han sido propuestos dos modelos: el primero considera que Wzz interactúa con Wzy y modularía su actividad al alternar entre dos estados funcionales, uno que favorecería la elongación de la cadena polisacáridica y el otro que favorecería su transferencia a la ligasa (WaaL); el segundo sugiere que Wzz podría actuar como una chaperona que permite la formación de un

complejo entre Wzy, WaaL y el polisacárido unido al und-P, determinándose la modalidad por la proporción de Wzy y WaaL asociadas.

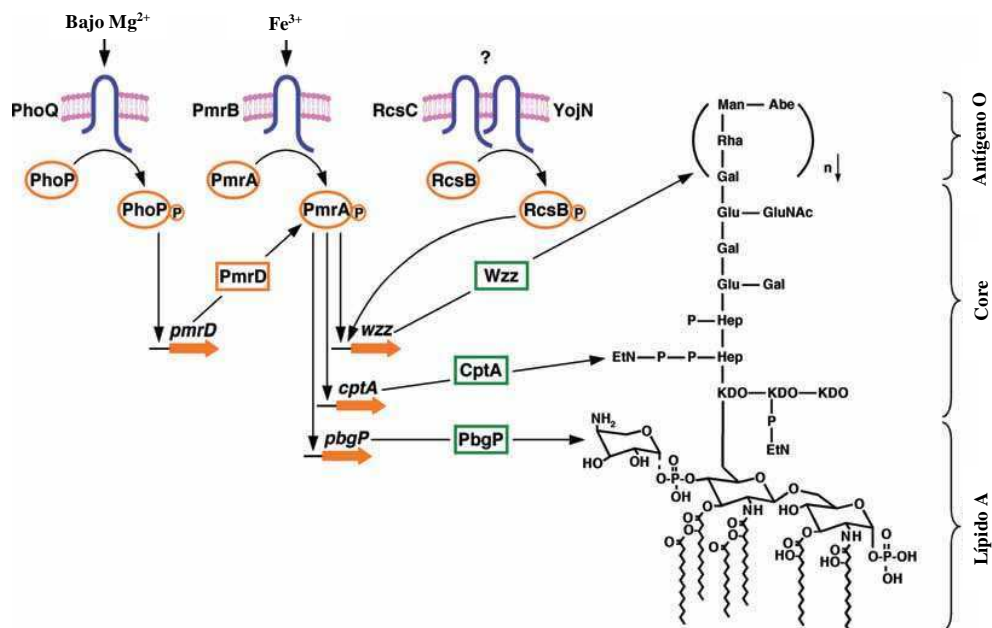
A pesar de que la función bioquímica de la proteína Wzz ha sido sujeto de varios estudios (Bastin y col., 1993; Morona R. y col., 1995; Whitfield y col., 1997; Daniels y Morona, 1999; Marolda y col., 1999), poco es lo que se sabe de la regulación de su expresión (Delgado M.A. y col., 2006)

## **Regulación de la síntesis del LPS**

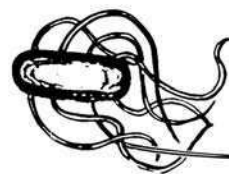
Un gran número de genes están involucrados en la síntesis del LPS, muchos de los cuales son parte de varios *clusters* localizados en diferentes regiones del cromosoma bacteriano y en algunos organismos también en plásmidos, como el plásmido que codifica para el polisacárido O:54 de *S. enterica* (Popoff M.Y. y col., 1985; Keenleyside W.J. y col., 1994).

Resulta lógico pensar que la expresión de genes de LPS debe estar coordinada, asegurando que todo componente esté disponible en cualquier condición de crecimiento. Diferentes estímulos ambientales han sido descritos como activadores de factores de transcripción que regulan modificaciones del LPS. Por ejemplo, los sistemas de dos componentes PmrA/PmrB y RcsC/YojN/RcsB de *S. Typhimurium*, cada uno activado por diferentes estímulos, promueven independientemente la transcripción del gen *wzz* (Delgado M. A. y col., 2006) (Fig. 4. 3). La expresión de *wzz* también es regulada por PhoP/PhoQ a través de PmrD, un regulador positivo (*upregulator*) mediado por PhoP, el cual se une a la forma fosforilada de PmrA protegiéndola de la desfosforilación a causa de PmrB (Kato A. y E.A. Groisman. 2004; Kox L.F. y col., 2000).

Si bien estos sistemas de dos componentes han sido objeto de numerosos estudios, la regulación de la síntesis del LPS no está completamente elucidada.



**Figura 4. 3. Caminos y señales que promueven la transcripción del gen *wzz* de *Salmonella*.** Una baja concentración de  $Mg^{2+}$  es sensed por la proteína PhoQ (sensor), la cual activa PhoP (regulador de respuesta). La activación de PhoP resulta en la expresión de la proteína PmrD, la cual activa la proteína PmrA postranscripcionalmente. El  $Fe^{3+}$  es reconocido por la proteína sensora PmrB, la cual activa la proteína PmrA (regulador de respuesta). La proteína PmrA activada se une a los promotores de *wzz* y *pbgP* activando su transcripción. El locus *pbgP* codifica para la proteína responsable de la síntesis e incorporación de 4-aminoarabinosa en el lípido A. El gen *wzz* codifica el determinante del largo de cadena del antígeno O. El gen *cptA* media la modificación de la región del core con fosfoetanolamina. La activación del sistema RcsC/YojN/RcsB promueve la transcripción del gen *wzz* independientemente de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB.



*Hipótesis y  
Objetivos*

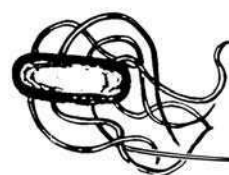
---

## Hipótesis y objetivos

**Hipótesis.** La proteína Dam participa en la regulación del gen *wzz* en *S. Enteritidis*, involucrado en la polimerización del antígeno somático O.

Para demostrar nuestra hipótesis nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión de la proteína *Wzz* en la mutante *SE $\Delta$ dam*
2. Investigar la actividad del promotor del gen *wzz* en la mutante *SE $\Delta$ dam*
3. Analizar la transcripción del gen *wzz* en la mutante *SE $\Delta$ dam*
4. Analizar la expresión de los reguladores del gen *wzz* *RcsC/YojN/RcsB* y *PmrA/PmrB* en la mutante *SE $\Delta$ dam*



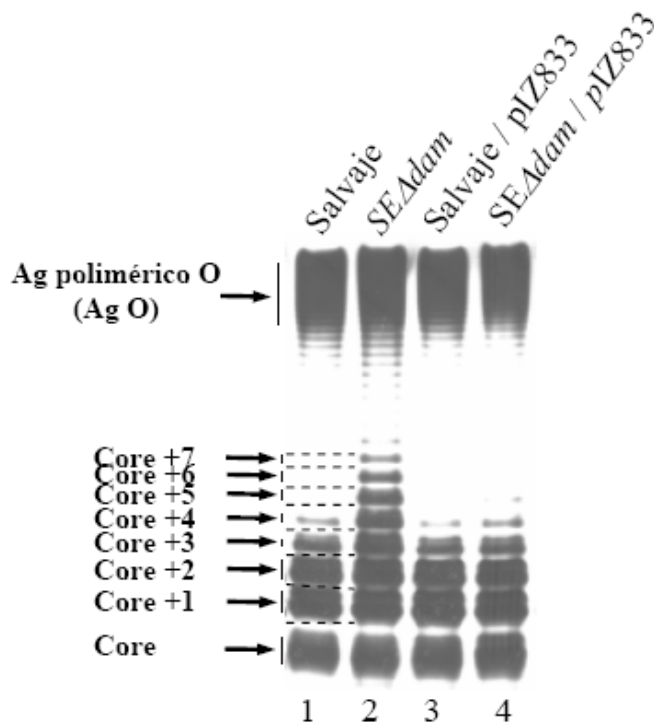
*Desarrollo  
Experimental*

---

## Desarrollo Experimental

### 1. Análisis del patrón del LPS en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

Durante los controles de rutina de nuestras mutantes advertimos que las cepas *dam* de *S. Enteritidis* (SD1 y SE $\Delta$ *dam*) no aglutinaban en presencia del suero anti O9, o lo hacían muy lentamente. Se decidió entonces analizar el patrón del LPS de la mutante SE $\Delta$ *dam*, y de la cepa parental por electroforesis y tinción con plata. La mutante SE $\Delta$ *dam* mostró una diferencia evidente en su patrón de LPS, el que presentó mayor cantidad de bandas en la región intermedia del gel (Fig. 4. 4, línea 2) en comparación al patrón de bandas del LPS de la cepa salvaje (Fig. 4. 4, línea 1). Esta región contiene polímeros O de bajo peso molecular, usualmente conteniendo de 1 a 5 unidades de antígeno O. Por otro lado, la cantidad de moléculas en la región polimérica del antígeno O no varió considerablemente (Fig. 4. 4). Por lo tanto, la diferencia observada en el patrón del LPS de SE $\Delta$ *dam* es consistente con un aumento en la cantidad de polímeros de cadena corta. Este resultado sugiere que la mutante SE $\Delta$ *dam* tiene alterada la distribución del largo de cadena polisacárida del antígeno O. Para determinar si el efecto está asociado a la falta de la enzima Dam, también examinamos el patrón de bandas del antígeno O de la cepa SE $\Delta$ *dam* complementada con el plásmido pIZ833 que codifica el gen funcional *dam*. El patrón de bandas de la cepa mutante complementada fue restaurado al patrón de LPS de la cepa parental. (Fig. 4. 4, línea 4). La cuantificación por densitometría a partir de los geles de LPS no mostró diferencias significativas en la cantidad total de Ag O relativo a la región del core entre las cepas SE $\Delta$ *dam* y salvaje ( $3.365 \pm 0.105$  y  $3.115 \pm 0.165$ , respectivamente). Este resultado sugiere que las cadenas polisacáridas cortas observadas en la mutante no se sintetizan a expensas de las cadenas largas. Por lo tanto, la metilación por Dam, participaría en la determinación del largo de cadena del antígeno polisacárido O en *S. Enteritidis*.



**Figura 4. 4. Análisis del patrón del LPS de cepas de *S. Enteritidis*.** Se estudió el patrón del LPS de la cepa salvaje (salvaje, salvaje / pIZ833) y mutante *dam* ( $SE\Delta dam$ ,  $SE\Delta dam$  / pIZ833) de *S. Enteritidis*. Se sembró igual cantidad de LPS en cada línea y se analizó por Tricine/SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 14 % (p/v) seguido de la tinción con plata.. La concentración de LPS fue determinada por medición de KDO usando el ensayo de *purpald*. El plásmido pIZ833 porta el gen *dam*. El gel que se muestra es representativo de nueve experimentos independientes.

## Conclusión parcial

La distribución anormal del largo de cadena del antígeno O en la mutante  $SE\Delta dam$  indicaría que la metilación por Dam participa en la regulación del largo de cadena polisacárida del antígeno O en *S. Enteritidis*.

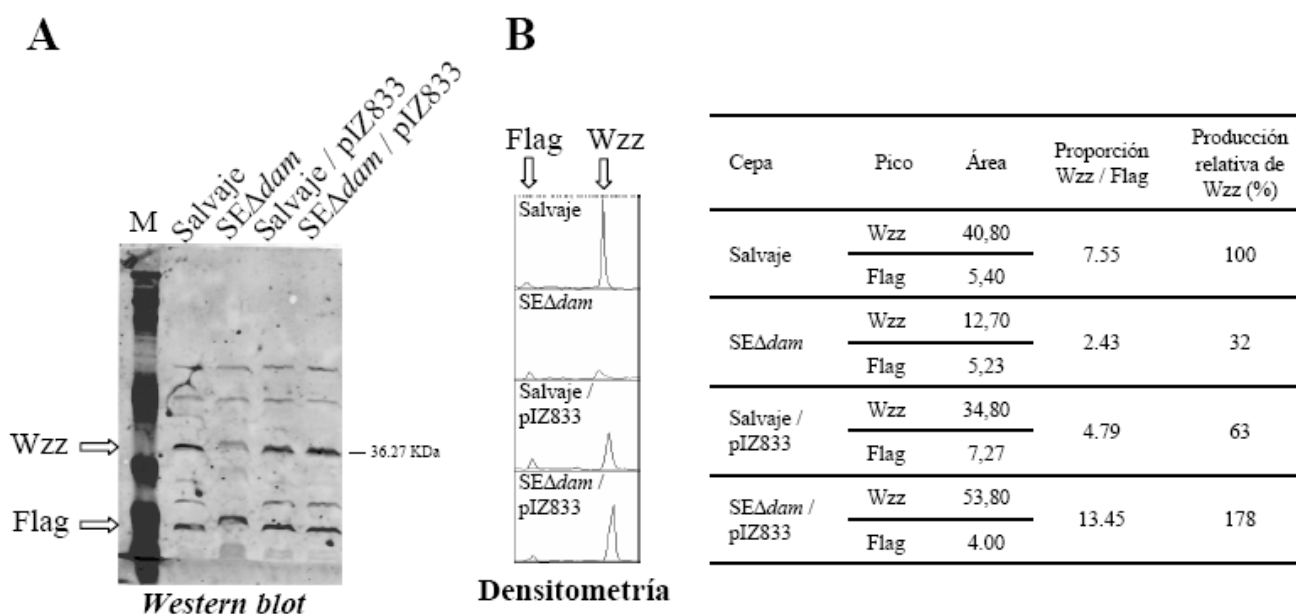
## 2. Estudio de la participación de la proteína Dam en la regulación de la síntesis de Wzz

Dado que Wzz es el responsable de la distribución del largo de cadena del antígeno O (Morona y col., 1995, Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002), investigamos si la metilación por Dam está involucrada en la regulación de la expresión de Wzz.



## 2.1. Expresión de la proteína Wzz en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

Se examinaron preparaciones de proteína de membrana a partir de la cepa parental, SE $\Delta$ *dam*, y complementada con pIZ833, mediante análisis de *Western blot* usando suero anti-Wzz (ver experimento representativo en Fig. 4. 5 A). Simultáneamente, los *blots* también fueron expuestos ante el anticuerpo anti-Flag, dado su reacción cruzada con una proteína de membrana desconocida de expresión constitutiva. Por lo tanto, la densidad de pixeles de estas bandas proteicas sirvieron como estándar interno de carga de muestra. El análisis de la densitometría normalizada, mostró que la cantidad relativa de proteína Wzz producida por la mutante *dam* es tres veces menor (32 %) que la de la cepa parental. (Fig. 4. 5 B).



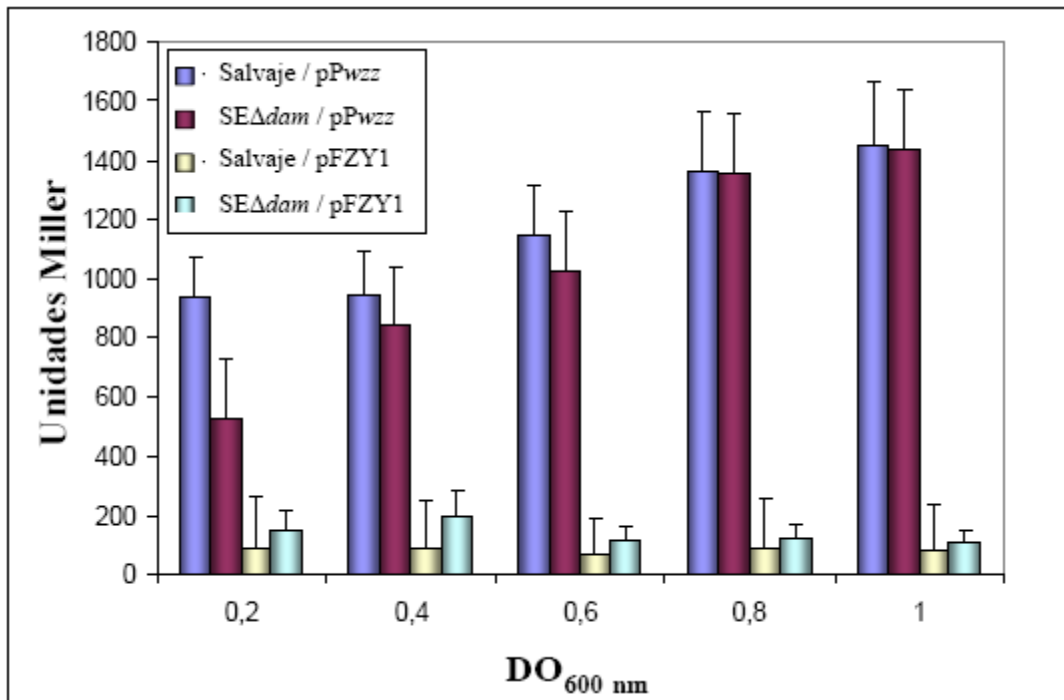
**Figura 4. 5. Cantidad de proteína Wzz en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*.** Se cultivaron las cepas bacterianas en caldo LB y se recolectaron a una DO<sub>600</sub> de 1. Las proteínas bacterianas fueron extraídas y la proteína Wzz fue analizada por *Western blot* (Panel A). La intensidad de las bandas de Wzz y de Flag fue medida por densitometría (Panel B). El plásmido pIZ833 lleva el gen *dam*. Se utilizó el *broad-range Prestained SDS-PAGE Standards* (Bio Rad) como marcador de peso molecular (Línea M). Datos representativos de tres experimentos independientes.

## 2.2. Actividad del promotor del gen *wzz* en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

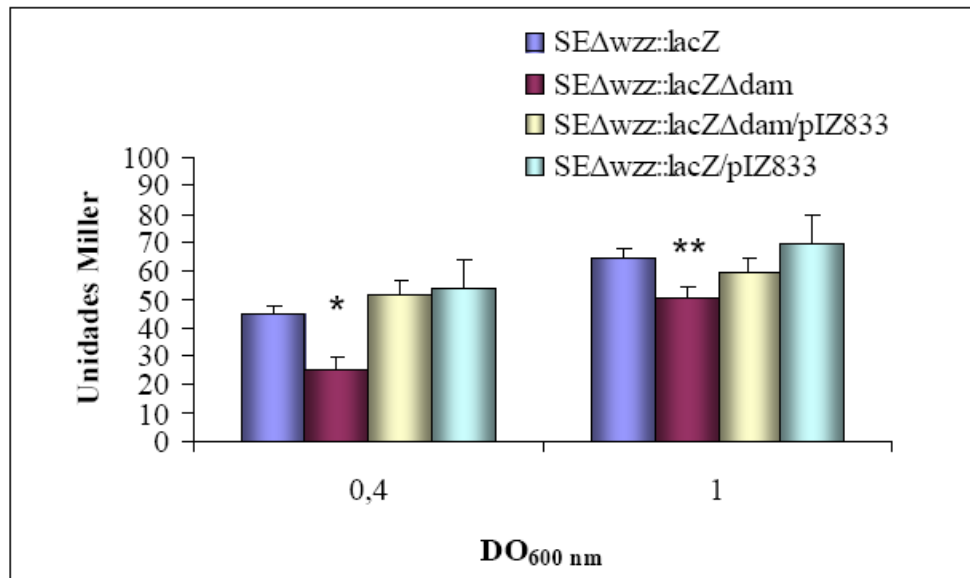
Dado que no siempre la transducción y/o estabilidad protéica se correlaciona con la actividad del promotor de un gen se decidió estudiar la actividad del promotor de *wzz* en la mutante *dam*.

En un principio, con el objeto de estudiar la regulación de la expresión del gen *wzz*, se construyó un plásmido conteniendo el gen de  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor de dicho gen (fusión *pwzz::lacZ*). Con esta fusión, se ensayó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa salvaje y mutante *dam*. La medición de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en cepas mutantes *dam* y salvajes transformadas con el plásmido, no reveló diferencias significativas en la actividad promotora de este gen a lo largo de toda la curva de crecimiento bacteriano (Fig. 4. 6). Estos datos indicarían que la enzima Dam no regula la transcripción o expresión del gen *wzz*. Sin embargo los resultados del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa podrían estar sesgados dada la participación de la enzima Dam, entre otras actividades, en la duplicación y herencia de plásmidos.

Por lo tanto, para comprobar la transcripción del gen *wzz* evitando la posibilidad de la existencia de más de una copia plasmídica por célula, determinamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa producida por la cepa parental y por la cepa mutante *SE $\Delta$ dam* que portan una fusión transcripcional *wzz::lacZY* en el cromosoma. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa fue medida en cultivos en fase exponencial y estacionaria ( $DO_{600}$  de 0.4 y 1.0, respectivamente). Como se muestra en la Fig. 4. 7, la actividad del promotor del gen *wzz* en *SE $\Delta$ wzz::lacZ $\Delta$ dam* se redujo cerca del 50 % en fase logarítmica y del 25 % en fase estacionaria, relativo al nivel de expresión en la cepa parental *SE $\Delta$ wzz::lacZ* ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente). Estos datos indicarían que la enzima Dam regula la expresión del gen *wzz*.



**Figura 4. 6. Actividad del promotor del gen *wzz* de cepas de *S. Enteritidis*.** Se estudio la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (unidades Miller) expresada por cepas que portan un plásmido con una fusión transcripcional *lacZY* al gen *wzz* (pPwzz).en diferentes DO<sub>600</sub> de la curva de crecimiento. Se investigó la actividad transcripcional en la cepa salvaje (barras azules) y en la mutante SE $\Delta$ dam (barras rojas). Se incluyó como control, cepas transformadas con el plásmido vector sin promotor (pFZY1): salvaje / pFZY1 (barras amarillas) y SE $\Delta$ dam / pFZY1 (barras celestes). Los datos corresponden a valores promedios  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.



**Figura 4. 7. Actividad del promotor del gen *wzz* de cepas de *S. Enteritidis*.** Se estudió la actividad de β-galactosidasa (unidades Miller) expresada por cepas que llevan en el cromosoma una fusión transcripcional *lacZY* al gen *wzz* en fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0.4) y estacionaria (DO<sub>600</sub> 1). Se investigó la actividad transcripcional en la cepa SEΔwzz::*lacZ* (barras azules) y en la mutante *dam* SEΔwzz::*lacZΔdam* (barras rojas) de *S. Enteritidis*. Se incluyó como control cepas transformadas con el plásmido que llevan el gen *dam*: SEΔwzz::*lacZ* / pIZ833 (barras celestes) y SEΔwzz::*lacZΔdam* / pIZ833 (barras amarillas). Los datos corresponden a valores promedios ± desvío estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p < 0.01 y \*\* p < 0.05 respecto a la cepa salvaje.

### 2.3. Transcripción del gen *wzz* en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*

Los resultados del punto 2.1 y 2.2 fueron confirmados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real, el cual reveló que la expresión del gen *wzz* fue tres veces menor en la mutante *dam* (cantidad relativa de ARNm = 0.313 + 0.025) comparado con la cepa parental (Tabla 4 1).

**Tabla 4. 1. Transcripción génica en la mutante *dam* de *S. Enteritidis***

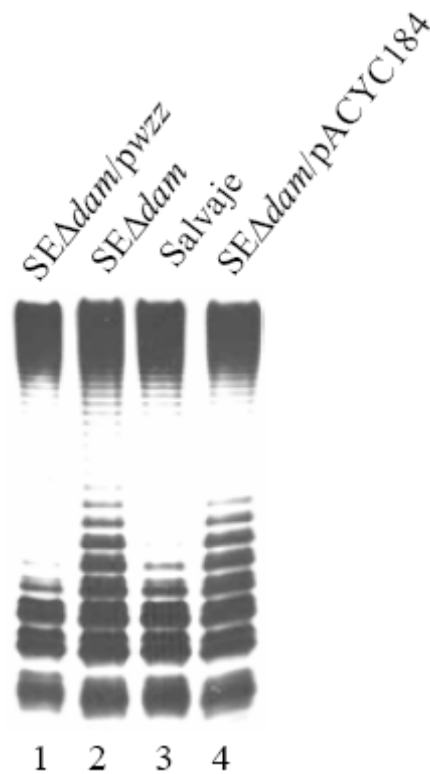
<b>Gen</b>	<b>Expresión rel.<sup>a</sup> ± DE</b>	<b>% de expresión rel.</b>	<b>Variación<sup>b</sup></b>
wzz	0.313 ± 0.025	31	↓ 3.19

<sup>a</sup> Expresión relativa. La cantidad relativa de ARNm de la mutante SE $\Delta$ *dam* se determinó por RT-PCR a tiempo real, relativo a los niveles de ARNm de la cepa parental de *Salmonella*, establecido como 1. Los valores son medias ± desviación estándar. Estos datos corresponden a valores de media de tres experimentos independientes realizados en duplicado.

<sup>b</sup>Variación comparada a la expresión relativa en la cepa parental de *Salmonella*.

#### **2.4. Producción de LPS en la cepa mutante *dam* de *S. Enteritidis* transformada con el gen *wzz***

Luego, también investigamos si un aumento de la expresión de *wzz* en la mutante SE $\Delta$ *dam* podría restaurar el patrón de bandas del antígeno O al de la salvaje. Para este propósito, la cepa SE $\Delta$ *dam* fue transformada con el plásmido pwzz el cual porta el gen *wzz* bajo la regulación del promotor del gen de resistencia a tetraciclina. Como se muestra en la Fig. 4. 8, la sobreproducción de *wzz* en la cepa SE $\Delta$ *dam* redujo la cantidad de cadenas polisacáridas cortas observada en la mutante *dam* (líneas 1 y 2), resultando en un patrón de LPS comparable con aquel encontrado en la cepa parental (línea 3). La transformación con el plásmido vector vacío (pACYC184) no produjo cambios en el patrón del antígeno O del LPS de la cepa SE $\Delta$ *dam* (Fig. 4. 8, línea 4) al igual que la transformación con plásmido que expresa en antisentido *wzz* (dato no mostrado). Estos resultados, concuerdan con lo demostrado en el punto anterior y confirmarían que Dam regula en cierta forma la expresión de Wzz.



**Figura 4. 8. Producción de LPS en la cepa mutante *dam* de *S. Enteritidis* transformada con el gen *wzz*.** Se sembró igual cantidad de LPS en cada línea y se analizó por Tricine/SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 14 % (p/v) seguido de la tinción con plata. Se determinó la concentración de LPS por medición de KDO usando el ensayo de *purpald*. El gel que se muestra es representativo de siete experimentos independientes.

### Conclusión parcial

El estudio del patrón del LPS de la mutante *dam* indica que la metilación por Dam participa en la síntesis del LPS. La metilación mediada por Dam controla el largo de cadena del antígeno O en *S. Enteritidis*, regulando la expresión de la proteína Wzz.

### 3. Análisis de la expresión de los reguladores del gen *wzz* en la cepa mutante *SEΔdam*

Dado que la expresión del gen *wzz*, es regulada en forma compleja por los sistemas de dos componentes PmrA/PmrB y RcsC/YojN/RcsB (Delgado M.A. y col., 2006) nos preguntamos si la regulación de la proteína Wzz mediada por la enzima Dam se realiza

en forma directa sobre el mismo gen *wzz* o en forma indirecta a través de sus dos reguladores conocidos.

### 3.1. Estudio de la transcripción de los reguladores de la expresión del gen *wzz*

Investigamos y comparamos la expresión de los genes *pmrA* y *rcsB*, dos reguladores del gen *wzz*, en la mutante *SEΔdam* con respecto a la cepa parental. La amplificación por RT-PCR cuantitativa a tiempo real demostró que la expresión de los genes *pmrA* y *rcsB* en la mutante *dam* fue del 56 % y 59 %, respectivamente, comparada con la de la cepa parental (Tabla 4. 2).

**Tabla 4. 2. Transcripción génica en la mutante *dam* de *S. Enteritidis*.**

Gen	Expresión rel. <sup>a</sup> ± DE	% de expresión relativa	Variación <sup>b</sup>
<i>rcsB</i>	0.593 ± 0.190	59	↓ 1.69
<i>pmrA</i>	0.560 ± 0.028	56	↓ 1.79

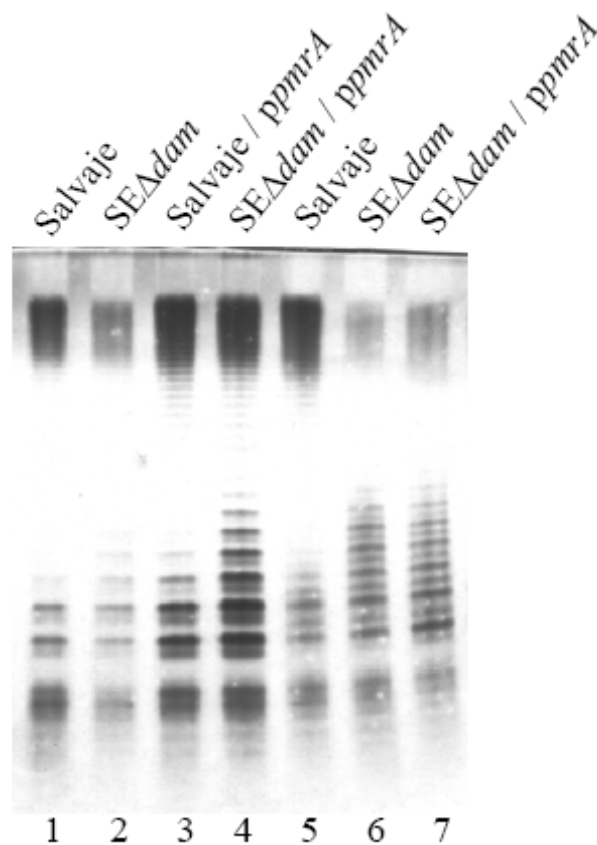
<sup>a</sup> Expresión relativa. La cantidad relativa de ARNm de la mutante *SEΔdam* se determinó por RT-PCR a tiempo real, relativo a los niveles de ARNm de la cepa parental de *Salmonella*, establecido como 1. Los valores son medias ± desviación estándar. Estos datos corresponden a valores de media de tres experimentos independientes realizados en duplicado.

<sup>b</sup> Variación comparada a la expresión relativa en la cepa parental de *Salmonella*.

### 3.2. Producción de LPS en la cepa mutante *dam* de *S. Enteritidis* transformada con el gen *pmrA* o *rcsB*

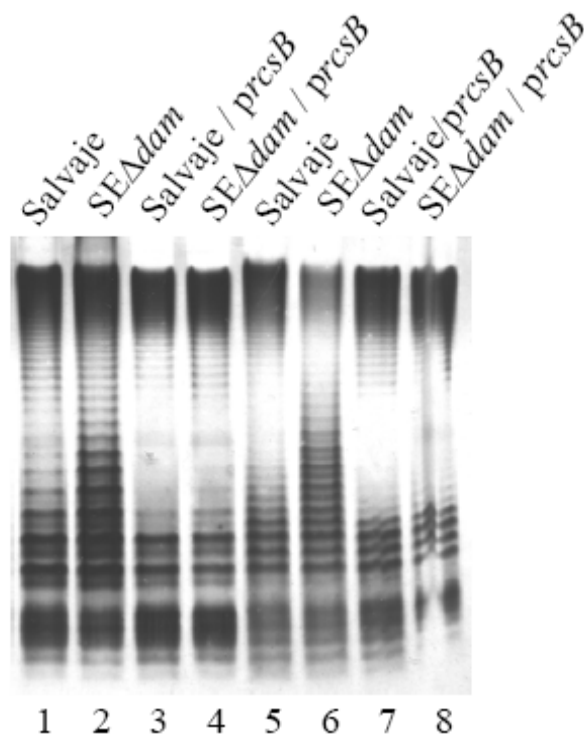
Nos preguntamos si la expresión reducida de *pmrA* y *rcsB* encontrada se relaciona al fenotipo de LPS de la mutante *dam*. En consecuencia, analizamos la producción del antígeno O en las cepas *SEΔdam* y parental que sobreexpresan PmrA y RcsB. No se observaron cambios en el patrón del antígeno O del LPS de la mutante *dam* que sobreexpresa PmrA (Fig. 4. 9), ni aún cuando las bacterias fueron incubadas en un ambiente que estimula el sistema de dos componentes PmrA/PmrB (Fe<sup>3+</sup> y bajo Mg<sup>2+</sup>)

(Delgado M. y col., 2006). Por el contrario, la sobreexpresión de RcsB en la mutante *dam* resultó en un patrón de bandas del antígeno O del LPS comparable con aquel de la cepa salvaje (Fig. 4. 10), sin importar la condición ambiental de crecimiento. La transformación con los plásmidos que expresan en antisentido PmrA, RcsB o que porta sólo el vector plásmido no produjo cambios en el patrón del antígeno O del LPS de ninguna cepa estudiada (dato no mostrado).



**Figura 4. 9. LPS de cepas de *S. Enteritidis* que sobreexpresa PmrA.** En cada línea se cargó igual cantidad de LPS y se analizó por Tricine/SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 14 % (p/v) seguido de la tinción con plata. Se determinó la concentración de LPS por medición de KDO usando el ensayo de *purpald*. Líneas 1- 4: bacterias cultivadas en medio N-mínimo conteniendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM; líneas 5- 7: bacterias cultivadas en medio N-mínimo conteniendo MgCl<sub>2</sub> 10 μM y FeSO<sub>4</sub> 100 μM. El gel que se muestra es representativo de siete experimentos independientes.

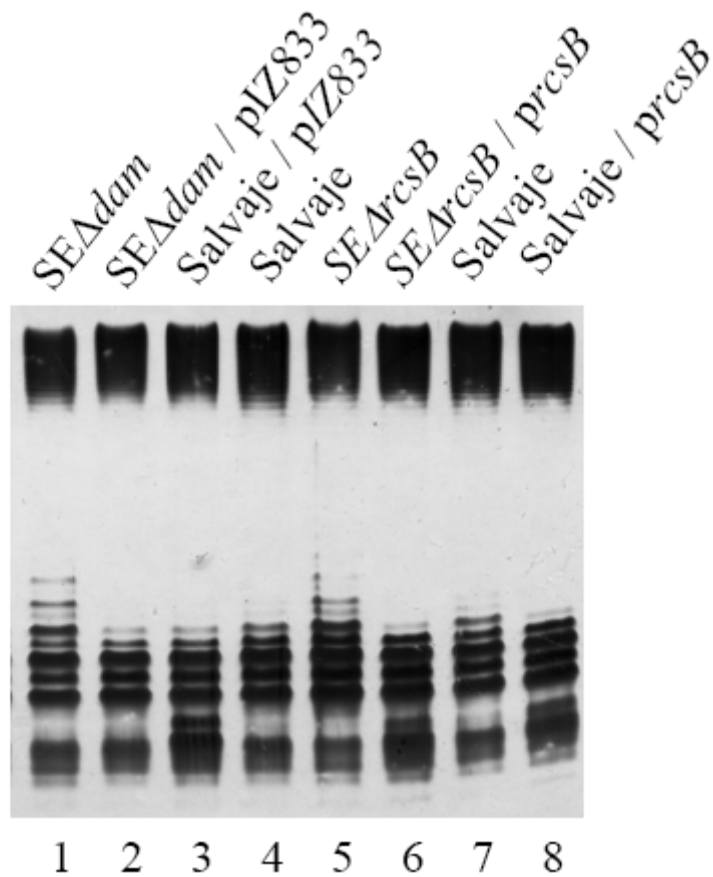




**Figura 4. 10. LPS de cepas de *S. Enteritidis* que sobreexpresan *RcsB*.** En cada línea se cargó igual cantidad de LPS y se analizó por Tricine/SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 14 % (p/v) seguido de la tinción con plata. Se determinó la concentración de LPS por medición de KDO usando el ensayo de *purpald*. Líneas 1- 4: bacterias cultivadas en medio N-mínimo conteniendo  $MgCl_2$  10 mM; líneas 5- 8: bacterias cultivadas en medio N-mínimo conteniendo  $MgCl_2$  10  $\mu$ M y  $FeSO_4$  100  $\mu$ M. El gel que se muestra es representativo de cinco experimentos independientes.

### 3.3. Estudio del patrón del LPS en ausencia del gen *rcsB*

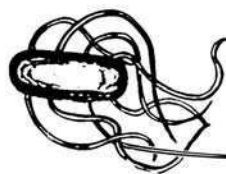
Basándonos en los resultados obtenidos hasta ahora, hipotetizamos que la ausencia de *RcsB* podría también llevar al mismo patrón de LPS obtenido en la mutante *dam*. Para comprobarlo, construimos una mutante delecionada en el gen *rcsB* de *S. Enteritidis* (*SEΔrcsB*) y examinamos su patrón del antígeno O de LPS, el cual resultó ser muy similar al patrón de bandas observadas para la mutante *dam* (Fig. 4. 11, líneas 1 y 5). La transformación con el plásmido portador del gen *rcsB* (*prcsB*) restauró el patrón de bandas de LPS de la cepa *SEΔrcsB* al de la cepa parental (Fig. 4. 11, línea 6).



**Figura 4. 11. Análisis del LPS de cepas mutantes *rcsB* y *dam* de *S. Enteritidis*.** Se sembró igual cantidad de LPS en cada línea y se analizó por Tricine/SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 14 % (p/v) seguido de la tinción con plata. Se determinó la concentración de LPS por medición de KDO usando el ensayo de *purpald*. El gel que se muestra es representativo de tres experimentos independientes.

### Conclusión parcial

En conjunto, nuestros resultados apoyan un modelo en el cual Dam modula la expresión del gen *wzz* en forma indirecta a través de *rcsB*.



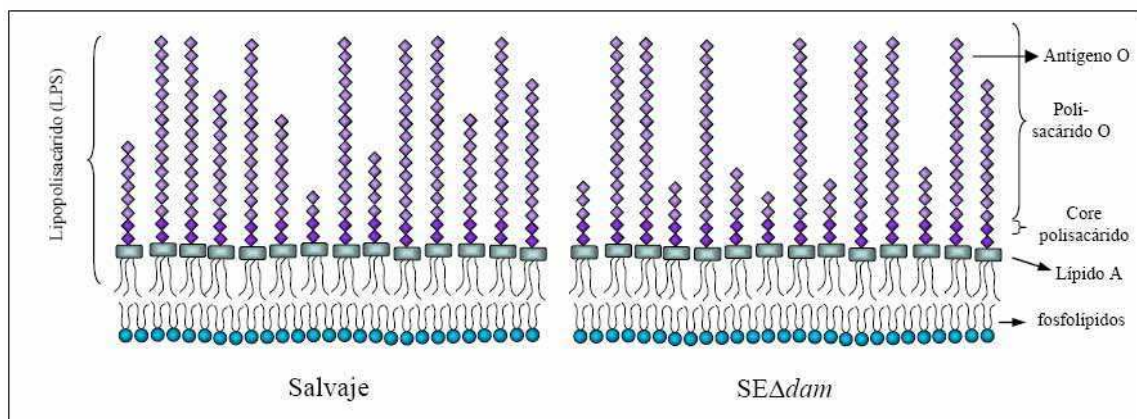
*Discusión*

---

## Discusión

Basados en observaciones previas que indicaban un defecto en la aglutinación con anti suero O9 por parte de las mutantes *dam* de *S. Enteritidis*, comenzamos por investigar el patrón de LPS en la mutante *SEΔdam*. Encontramos que en ausencia de la enzima Dam hay un aumento en la cantidad de polímeros de cadena corta, indicando que la distribución del largo de cadena polisacárida del antígeno O podría estar alterada.

A partir del análisis densitométrico que indicó que las cadenas polisacáridicas cortas observadas no se sintetizan a expensas de las cadenas largas, proponemos el siguiente esquema que muestra las diferencias en el LPS entre la cepa salvaje de *S. Enteritidis* y la mutante *SEΔdam*.



**Esquema de la membrana externa de la cepa salvaje y mutante *dam* (*SEΔdam*).** La ausencia de la enzima Dam afecta el patrón del LPS incrementando la cantidad de polímeros más cortos.

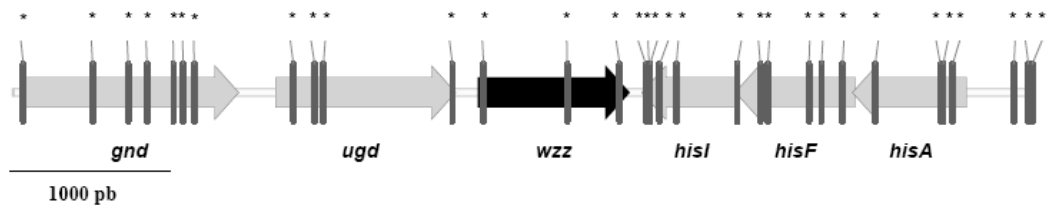
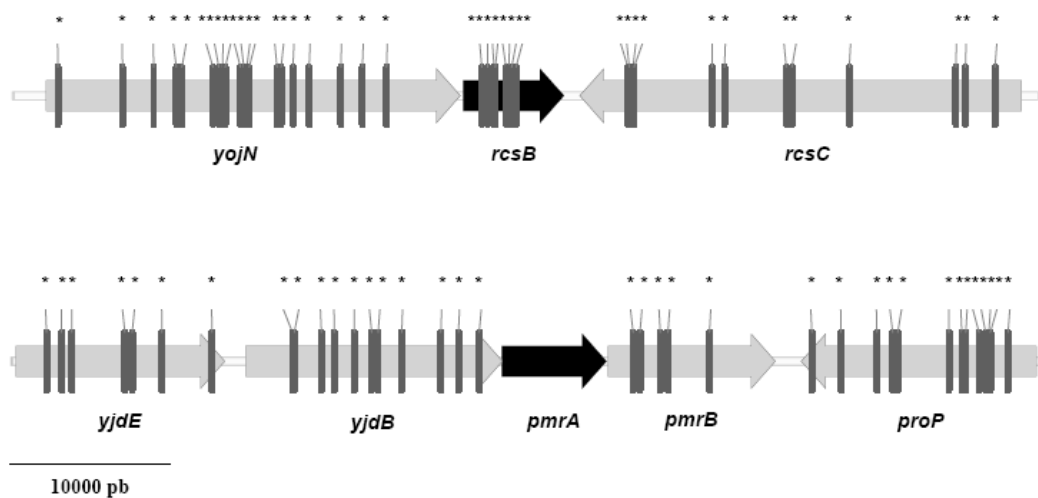
La participación de la metilación del ADN por Dam en la síntesis del LPS no parece ser exclusivo de *Salmonella* spp.; detectamos el mismo fenómeno en una cepa *dam* de *E. coli* (datos no mostrados) que presentó un patrón de LPS con mayor cantidad de polisacáridos cortos. En *Yersinia enterocolitica*, Fälker S. y col. (2007) demostraron que las cepas sobreproductoras de Dam presentan un incremento en la cantidad de moléculas de LPS rugosas. Más aún, estos autores sugieren que la metilación por Dam afecta la estabilidad de especies cortas de LPS o que influye en el agregado de la primera unidad del antígeno O a la cadena creciente. Todos estos hallazgos indicarían

que la metilación por Dam juega un papel general en la expresión del antígeno O del LPS en enterobacterias.

Dado que la distribución del largo de cadena del LPS es regulada por la proteína Wzz (Morona R. y col., 1995; Raetz C.R.H. y C. Whitfield, 2002), analizamos la expresión del gen *wzz* en la mutante *SEΔdam*. La menor cantidad de proteína Wzz, conjuntamente con la disminuida actividad promotora del gen *wzz* y la consecuente disminución en su transducción, demuestran claramente que la actividad Dam modula la expresión del gen *wzz*.

Es lógico suponer entonces que el locus del gen *wzz* contenga secuencias GATC con el potencial de ser metilados por Dam. Efectivamente, el análisis *in silico* que se muestra a continuación, revela la presencia de tres motivos GATC en la secuencia codificante de *wzz* y cuatro secuencias GATC río arriba del gen. La metilación por Dam de cualquiera de estos *clusters* GATC podría regular la expresión de *wzz*, aunque por diferentes mecanismos. Por un lado, un *cluster* GATC localizado dentro de la secuencia codificante de un gen dado afecta la estabilidad del ADN, dependiendo del estado de metilación, y en consecuencia permitiendo/impidiendo su expresión. (Riva A. y col., 2004). Por otro lado, la metilación por Dam, incluso en un sólo motivo GATC localizado río arriba de un gen dado, afecta la interacción entre proteínas reguladoras con su sitio de unión al ADN (Braaten B.A. y col., 1992; Łyzeń R. y col., 2006; Marinus M.G., 1985; Marolda C.L. y col., 2008; Polaczek P. y col., 1998).

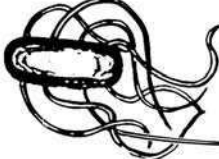
La regulación de la expresión de *wzz* por la metilación por Dam podría también ocurrir en forma indirecta. Esto es, por ejemplo, que la metilación por Dam regule la expresión de otros genes cuyos productos están involucrados en la regulación o transcripción del gen *wzz*. Se sabe que los dos sistemas de dos componentes PmrA/PmrB y RcsC/YojN/RcsB promueven, independientemente, la transcripción del gen *wzz* dado que la mutante *pmrA rcsB* de *S. Typhimurium* no expresa Wzz (Delgado M.A. y col., 2006). En teoría, la expresión de *pmrA* y *rcsB* podría ser regulada por la metilación por Dam, dado que existen motivos GATC río arriba de ambos genes (ver esquema más abajo). Interesentemente, no hay ningún motivo GATC presente en la secuencia codificante de *pmrA* mientras que en *rcsB* hay ocho secuencias GATC río abajo del codón +1 en un intervalo de 224 pb., una densidad tres veces más alta que la esperada para una distribución al azar (ver esquema más abajo).

**A****B**

**Distribución de secuencias GATC.** (A) región del gen *wzz*. (B) región de los genes *pmrA* y *rscB*. Las líneas verticales y los asteriscos denotan la localización de motivos GATC. Basado en Refseq: NC\_011294 de *S. Enteritidis*.

Los experimentos de RT-PCR a tiempo real indican que los niveles de ARNm de ambos genes reguladores, *rscB* y *pmrA*, están reducidos en la mutante *dam*. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Balbontin R. y col. (2006) en mutantes *dam* de *S. Typhimurium*. A pesar de que la expresión de *rscB* y *pmrA* está reducida en el *background* de la mutante *dam*, el defecto de la distribución del largo de cadena del antígeno O de estaría sólo asociado con RcsB. De hecho, sólo cuando RcsB fue sobreexpresado, el patrón del antígeno O del LPS fue similar al de la cepa parental. La falta de restauración del patrón del LPS por la sobreexpresión de *pmrA* es consistente con estudios previos que demuestran que la ausencia de PmrA no causa una alteración observable en el patrón del LPS en *S. Typhimurium* (Delgado M.A. y col., 2006). Por el contrario, la falta de RcsB generó un LPS con un aumento en la cantidad de cadenas

polisacáridas cortas, similar al de la cepa *SE $\Delta$ dam*. La participación de RcsB en la regulación de la polimerización fue descrita previamente en *S. Typhimurium* (Delgado M.A. y col., 2006). Interesantemente, la falta de RcsB en *S. Typhimurium* no aumentó la cantidad de polisacáridos más cortos, como encontramos aquí en la cepa *S. Enteritidis*, pero afecta la movilidad en aquellas bandas que contienen 6-10 y 16-22 subunidades O, unidas a la región lípido A-core. Esto sugiere la existencia de sutiles diferencias en la regulación del largo de cadena del antígeno O entre las dos serovariedades. Se requiere de la realización de más experimentos para confirmar estas diferencias.



*Conclusiones*

---

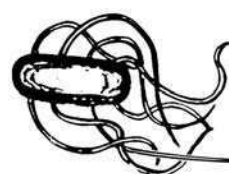


## Conclusiones

El objetivo del presente capítulo fue investigar la participación de la metilación por la enzima Dam en la síntesis del LPS de *S. Enteritidis*.

Nuestros experimentos muestran que la síntesis de *Wzz*, cuya función es la regulación del largo de cadena del LPS, es regulada positivamente por la enzima Dam en *S. Enteritidis*. Los dos reguladores conocidos de la expresión de *wzz*, se expresan en forma reducida en la mutante *dam*, sin embargo, el patrón del LPS de la cepa *dam* sólo revirtió cuando se sobreexpresó RcsB. Estos resultados indicarían que Dam regula la expresión de *wzz* a través de RcsB.

En resumen, en este capítulo se muestra a *rscB* y *wzz* como nuevos blancos regulados por metilación por Dam, demostrando que la metilación del ADN no sólo afecta la expresión de proteínas de superficie bacteriana si no también la expresión de polisacáridos de superficie.



***Materiales y  
Métodos***

---

## Materiales y Métodos

### 1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados se describen en la Tabla 4. 3. La cepa *S. Enteritidis* #5694 fue utilizada para construir todas las cepas mutantes. Las deleciones génicas se realizaron como describe Datsenko K.A. y B.L. Wanner (2000). Los *primers* utilizados para mutagénesis se muestran en la Tabla 4. 4. Las bacterias fueron incubadas en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook J. y col., 1989) suplementado, cuando fue necesario, con antibióticos para alcanzar las siguientes concentraciones finales: ampicilina, 100 µg/ml; cloranfenicol, 30 µg/ml; kanamicina, 40 µg/ml; y tetraciclina, 20 µg/ml. Para los experimentos de sobreproducción de PmrA y RcsB las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio N-mínimo (Snavely M.D. y col., 1991) suplementado con 0.2% (w/v) glucosa, 0,1 mg/ml casaminoácidos, 2 µg/ml Vitamina B1 y 10 mM MgCl<sub>2</sub> (concentración alta de Mg<sup>2+</sup>) o 10 µM MgCl<sub>2</sub> 100 µM FeSO<sub>4</sub> (concentración baja de Mg<sup>2+</sup> y con Fe<sup>3+</sup>) (Delgado M.A. y col., 2006).

**Tabla 4. 3. Cepas y plásmidos utilizados**

	Característica relevante	Referencia o fuente
<b>Cepas</b>		
<i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis		
#5694	Salvaje	Colección del Dr. F. Collins
SEΔ <i>dam</i>	Δ <i>dam</i>	Esta Tesis
SEΔ <i>rscB</i>	Δ <i>rscB</i>	Esta Tesis
SEΔ <i>wzz::lacZ</i>	#5694, Δ <i>wzz<sub>st</sub>::lacZY</i> , Km <sup>rb</sup>	Esta Tesis
SEΔ <i>wzz::lacZΔdam</i>	#5694, Δ <i>wzz<sub>st</sub>::lacZY</i> , Km <sup>rb</sup> , Δ <i>dam</i>	Esta Tesis
<i>Escherichia coli</i> K-12		
DH5α	F- φ80 <i>lacZM15 endA recA hsdR(r<sub>K</sub>m<sub>K</sub>) supE thi gyrA relA Δ(lacZYA-argF) U169</i>	Cepario de nuestro laboratorio
	Característica relevante	Referencia o fuente

## Plásmidos

pACYC184	Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> , Vector de clonación	Rose R.E., 1988
pCE36	<i>ahp</i> FRT <i>lacZY</i> <sup>+</sup> <i>t<sub>his</sub></i> oriR6K	Ellermeier C.D. y col., 2002
pCP20	<i>FLP</i> <sup>+</sup> , $\lambda$ cI857 <sup>+</sup> , $\lambda$ p <sub>R</sub> Rep <sup>ts</sup> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Datsenko K.A. y B.L. Wanner, 2000
pFZY1	Vector de clonado de bajo número de copias sin promotor, Amp <sup>R</sup> F' <i>lac</i> replicon, <i>LacZ</i> <sup>+</sup> <i>Y</i> <sup>+</sup> <i>A</i> <sup>+</sup>	Koop A.H. y col., 1987
pIZ833	Gen <i>dam</i> de <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Torreblanca J. y col., 1999
pKD3	Plásmido templado para mutagénesis, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Datsenko K.A. y B.L. Wanner, 2000
pKD4	Plásmido templado para mutagénesis, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Datsenko K.A. y B.L. Wanner, 2000
pKD46	$\gamma$ , $\beta$ , y <i>exo</i> de fago $\lambda$ , <i>araC</i> - <i>P<sub>araB</sub></i> , Amp <sup>R</sup>	Datsenko K.A. y B.L. Wanner, 2000
<i>ppmrA</i>	<i>pmrA</i> ; Amp <sup>R</sup> (derivado de pUC18)	Esta Tesis
<i>ppmrAas</i>	<i>pmrA</i> clonado en orientación antisentido al promotor <i>P<sub>lac</sub></i> ; Amp <sup>R</sup> (derivado de pUC18)	Esta Tesis
pPwzz	Vector pFZY1 conteniendo un fragmento de 1300 pb de la región intergénica de <i>wzz-ugd</i> de <i>S. Enteritidis</i> #5694	Esta Tesis
<i>prcsB</i>	<i>rcsB</i> ; Amp <sup>R</sup> (derivado de pUC18)	Esta Tesis
<i>prcsBas</i>	<i>rcsB</i> clonado en orientación antisentido al promotor <i>P<sub>lac</sub></i> ; Amp <sup>R</sup> (derivado de pUC18)	Esta Tesis
pUC18	Vector de clonado de alto número de copia, Amp <sup>R</sup>	GenBank/EMB L L09136
pwzz	<i>wzz</i> ; Cm <sup>R</sup> (derivado de pACYC184)	Esta Tesis
pwzzas	<i>wzz</i> clonado en orientación antisentido al promotor <i>P<sub>lac</sub></i> ; Cm <sup>R</sup> (derivado de pACYC184)	Esta Tesis

**Tabla 4. 4. Oligonucleótidos usados en este estudio**

Gen Blanco	Primer <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup> (5'→3')
<b>Delesión de gen</b>		
<i>dam</i>	<i>dam</i> ::Cm (F)	TTCTCCACAGCCGGAGAAGGTGTAATTAGTT AGTCAGCATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	<i>dam</i> ::Cm (R)	GGCAATCAAATACTGTTTCATCCGCTTCTCCT TGAGAATTACATATGAATATCCTCCTTAG
<i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> ::Km (F)	CCTACGTCAAAGCTTGCTGTAGCAAGGTAG CCCAATACAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	<i>tcsB</i> ::Km (R)	ATAAGCGTAGCGCCATCAGGCTGGGTAACGT AAAAGTGATTTACATATGAATATCCTCCTTAG

## Fusión chromosomal *lacZY*

<i>wzz</i>	<i>wzz::Km (F)</i>	TACTGTCTCCAGCTTCATCCTTTTTTTAGTT AGGGTATCTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	<i>wzz::Km (R)</i>	TACCTTTTGAAGCCGACCACCATCCGGCAA GAAGCTTACATATGAATATCCTCCTTAG
<b>Clonación de gen</b>		
<i>pmrA</i>	<i>pmrA-F</i>	GATCGAATTCATGAAGATACTGATTGTTGAAG ACGAC ( <i>EcoRI</i> )
	<i>pmrA-R</i>	GATCGAATTCCTTAGCTTTCCTCAGTGGCAACC ( <i>EcoRI</i> )
<i>rcsB</i>	<i>rcsB-F</i>	GATCGAATTCATGAACAATATGAACGTAATT ATTG ( <i>EcoRI</i> )
	<i>rcsB-R</i>	GATCGAATTCCTTATTCTTTGTCTGTCGGACTC ( <i>EcoRI</i> )
<i>wzz</i>	<i>wzz-F</i>	GCTTACAAGGCTTTTGGC
	<i>wzz-R</i>	TAGGGTATCTATGACAGTGGAT
<b>Clonación de promotor</b>		
<i>wzz</i>	<i>Pwzz-F</i>	TTTAAGCTTAGATACCCTAACTAAAAAAGGATG AAGC ( <i>HindIII</i> )
	<i>Pwzz-R</i>	TTTGAATTCAAAATCACGATATCCGGGACGGG ( <i>EcoRI</i> )
<b>Primers utilizados para verificar la construcción predicha/deseada</b>		
<i>dam</i>	<i>rpe</i>	TACGACAACCTGAACGGTTG
	<i>damX</i>	GCAGCGTGCGGTCAACATG
pUC18	down <i>lacZ</i> 18	CGTCAGCGGGTGTGGCGG
<i>rcsB</i>	<i>yojN</i>	AGAGGTTGTATACTGAGGCGGC
	<i>rcsC</i>	CTGGCGGAAGAGAAACAACG
<i>wzz</i>	<i>His</i>	GCGGCCACCGTCAATGATCG
	<i>Ugd</i>	CATTATTTCCAACAGGATGGCGGC
	<i>Kmr</i>	CCATGTTGGAATTTAATCGCGGCC
	<i>LacZrevcheck</i>	ACCAGGCAAAGCGCCATTCG
<b>Real-time PCR</b>		
<i>16s</i>	q-16s-F	GCCGCAAGGTTAAAACTCAA
	q-16s-R	AAGGCACCAATCCATCTCTG
<i>pmrA</i>	q- <i>pmrA</i> -F	AACCAGCATGTAGCCAAACC
	q- <i>pmrA</i> -R	AACCCTCGACCAACACTCTG
<i>rcsB</i>	q- <i>rcsB</i> -F	ACCGCAGCATTAAAGACCATC
	q- <i>rcsB</i> -R	CTCAGGGTGACGGAAGAGAG
<i>wzz</i>	q- <i>wzz</i> -F	CGTCGCTTCGTTCTGTATCA
	q- <i>wzz</i> -R	AGGATGTTACCCAGGACACG

---

Los *primers* fueron obtenidos de Invitrogen Inc. y fueron diseñados de acuerdo a la información de secuencia de ADN disponible para la cepa de *S.*

Enteritidis (*Salmonella* spp. comparative sequencing blast server Blast Server Database from [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

<sup>a</sup> F, cebador directo (*primer forward*); R, cebador inverso (*primer reverse*).

<sup>b</sup> Los nucleótidos en *itálica* indican la secuencia homóloga a pKD3, pKD4 o pCE36; la región subrayada y en *itálica* indican los sitios de corte de las enzimas endonucleasas de restricción (se muestra en paréntesis) que fueron incorporadas a la secuencia de *primers*.

## 2. Técnicas de transformación

### 2.1. Transformación con CaCl<sub>2</sub>

Se utilizó esta técnica de transformación sólo para los casos en donde se pretendía recuperar un plásmido con un gen o promotor clonado.

#### 2.1.1. Obtención de células competentes

Para la preparación de la células a transformar con la técnica de CaCl<sub>2</sub> se cultivaron las cepas DH5α en caldo LB durante 18 hs. con agitación. Un 1 % de ese precultivo, se subcultivó en 20 ml de caldo LB durante 3 hs. en agitación a 37 °C. Luego, se incubó en hielo durante 10 min. y se centrifugó a 4.000 r.p.m. y 4 °C durante 8 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet*, fracción con bacterias, en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril y se mantuvo en hielo por 15 min. Se repitió la centrifugación y el *pellet* obtenido se resuspendió en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM para ser utilizado en el ensayo de transformación, previo a su incubación a 4 °C durante 12 hs.

#### 2.1.2. Ensayo de transformación

Los ensayos de transformación se realizaron tomando 200 µl de células competentes, a los cuales se les añadió 2 µl (180 ng) de plásmido a utilizar y 98 µl de *buffer* de transformación. La mezcla se agitó y se incubó en hielo durante 30 min. para permitir la adsorción de las moléculas de ADN a la pared celular de las bacterias. Luego, se incubó durante 3 min. a 42 °C y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. para permitir el ingreso del ADN a la célula. Se agregó 1 ml de caldo LB y se incubó a 37 °C durante 60 min. sin agitación para permitir la replicación y propagación del plásmido dentro de las células. Por último, se sembraron las distintas diluciones en placas de agar TSA con el correspondiente antibiótico, de modo de seleccionar positivamente a las células que fueron transformadas con el plásmido.

## **2.2. Transformación por electroporación**

Se utilizó esta técnica de transformación sólo para los casos en donde se pretendía obtener cepas portadoras de los plásmidos con los genes ya clonados como así también complementadas.

### **2.2.1. Obtención de células electrocompetentes**

La preparación de las células competentes, se realizó como se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

### **2.2.2. Ensayo de electroporación**

Para la obtención de las cepas portadoras de plásmidos, se electroporaron las bacterias electrocompetentes como se describe en “Materiales y Métodos” del Capítulo 1.

## **3. Construcción de la fusión transcripcional *lacZ* al promotor del gen *wzz* en el plásmido pFZY1**

El clonado del promotor de *wzz* se realizó amplificando su región usando la polimerasa *Pfu* con los *primers* *Pwzz-F* que lleva un sitio de restricción *HindIII* (subrayado y en *itálica*, Tabla 4. 4) localizado a 1 base río arriba del codón de iniciación de *wzz* (en *itálica*, Tabla 4. 4) y *Pwzz-R* que lleva un sitio de restricción *EcoRI* (subrayado y en *itálica*, Tabla 4. 4) localizado a 1 base río abajo del codón de iniciación del gen *ugd*, los cuales fueron diseñados acorde a la información de secuencia de ADN disponible para la secuencia de la cepa de *S. Enteritidis* (Koop A.H. y col., 1987). El producto de PCR fue digerido con *HindIII* y *EcoRI* y ligado en el plásmido pFZY1 previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pPwzz. pFZY1 es un vector de copia única diseñado para la construcción de fusiones transcripcionales al operón *lacZ* (Miller J.H., 1972). El plásmido resultante, pPwzz, fue utilizado para transformar las cepas salvaje de *S. Enteritidis* y la cepa mutante SE $\Delta$ *dam*. El vector pFZY1 fue también utilizado para transformar las mismas cepas, que fueron usadas como control negativo.

#### **4. Construcción de la fusión transcripcional cromosómica *lacZY* al promotor del gen *wzz***

El gen *wzz* de la cepa *S. serovar* Enteritidis #5694 fue interrumpido como se describió previamente (Ellermeier C.D. y col., 2002). Los sitios FRT generados por la escisión del cassette de resistencia a kanamicina fueron usados para integrar el plásmido pCE36 (Ellermeier C.D. y col., 2002), generando una fusión transcripcional *lacZY* al promotor del gen *wzz* en el cromosoma bacteriano. La cepa resultante se denominó *SE $\Delta$ wzz::lacZ*. También se construyó una cepa derivada *SE $\Delta$ wzz::lacZ  $\Delta$ dam* por el método de Datsenko K.A. y B.L. Wanner (2000). Para experimentos de complementación, el plásmido pIZ833 que porta el gen *dam* fue introducido por electroporación en la cepa mutante.

#### **5. Clonado molecular de los genes *pmrA* y *rcsB* de *S. Enteritidis***

El ADN extraído de la cepa parental *S. Enteritidis* #5694 fue usado como molde en la reacción de PCR para amplificar los genes *pmrA* y *rcsB*. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un PTC-0200 *DNA engine* (M.J. Research) utilizando la polimerasa *Pwo* (Roche) o *Taq* polimerasa (Qiagen). Para ambos genes, los fragmentos del producto de PCR fueron separados en geles de agarosa, purificados usando un *kit* comercial, *Gel Extraction kit* de QIAGEN, y luego se digirieron usando la enzima de restricción *EcoRI* (Roche Diagnostics). Estos fragmentos se ligaron al vector pUC18, el cual previamente había sido digerido con *EcoRI*, usando ligasa de ADN T4 (*Rapid Ligation kit*, Roche Diagnostics). Las células DH5 $\alpha$  de *E. coli* se transformaron con la mezcla de ligación mediante el protocolo de cloruro de calcio (Cohen S.N. y col., 1972). Las transformantes se sembraron en placas con agar LB con ampicilina y X-Gal 0,2% (w/v). Las colonias con fenotipo color blanco fueron tomadas y tamizadas por PCR, usando los *primers* *downlacz18* combinados con *rcsB-F*, *rcsB-R*, *pmrA-F* o *pmrA-R* y por digestión con enzimas de restricción para una identificación preliminar de la orientación del inserto (sentido o antisentido). La orientación del inserto se confirmó por secuenciación de ADN usando el *primer* de secuenciación M13 *forward* y M13 *reverse*, por análisis con Sequencher (Gene Codes Corporation) y con el *software* Vector NTI. Las reacciones de secuenciación del ADN se realizaron en el *DNA Sequencing Facility* del instituto *Robarts Research Institute (University of Western Ontario, London, Ontario, Canadá)*.



## 6. Clonado molecular del gen *wzz* de *S. Enteritidis*

La reacción de amplificación por PCR se realizó usando la ADN polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen). El producto resultante de la reacción de PCR, de extremos romos, se purificó usando un Kit de extracción a partir de gel (*Gel extraction kit* de Qiagen) y se ligó con ADN ligasa T4 (New England BioLabs) al vector pACYC184, el cual fue digerido con *EcoRV*, y cuyos extremos romos fueron defosforilados con la enzima *Alkaline Phosphatase shrimp* (Roche Diagnostics). La mezcla de ligación fue usada para transformar células DH5 $\alpha$  competentes por cloruro de calcio. Se aislaron los plásmidos de células transformantes Cm<sup>R</sup> y se tamizaron con endonucleasa de restricción para verificar la correcta orientación y el tamaño apropiado del inserto. La integridad del inserto fue confirmada por secuenciación (Macrogen Inc.) y analizada con Sequencher (Gene Codes Corporation) y con el software Vector NTI.

## 7. Perfil y análisis de LPS

Los LPS de las cepas de *Salmonella* se obtuvieron mediante extracción fenólica con calor (Marolda C.L. y col., 1990). Brevemente, las cepas cultivadas en placas crecidas por 18 hs. a 37 °C se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 2.0 en un volumen final de 100  $\mu$ l. Luego, las muestras fueron suspendidas en un *buffer* de lisis conteniendo proteinasa K como describe Hitchcock P.J. y T.M. Brown (1983), seguido de una extracción fenólica con calor y de la subsecuente extracción de la fase acuosa con éter. Los LPS se resolvieron por electroforesis en un sistema de gel 14 % (p/v) de poliacrilamina con Tricita - dodecil sulfato de sodio (SDS) – PAGE (Lesse A.J. y col., 1990; Schagger H. y G. von Jagow, 1987) y se visualizaron con tinción con plata. En cada línea de los geles, se cargó la misma concentración de LPS determinada por el ensayo de *purpald* midiendo concentración de ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO) (Osborn M.J., 1963). El análisis densitométrico se realizó usando el *software* ImageJ. Se calculó la tasa de intensidad de banda perteneciente al core relativa a la intensidad media de las bandas que corresponden al Ag polimérico O y Core + *n*, mediante la cuantificación de pixeles en una ventana angosta a través del centro de cada línea.

## 8. Estudio de $\beta$ -Galactosidasa

Las bacterias se cultivaron por 18 hs. en LB, se subcultivaron (1:50) y se incubaron en 100 ml del mismo medio en agitación. A diferentes puntos del crecimiento, según se

indica, se tomaron las muestras para medir el crecimiento bacteriano ( $DO_{600}$  y recuento bacteriano). La actividad del promotor del gen *wzz* en cepas portadoras del plásmido pP<sub>wzz</sub> o de cepas con la construcción de la fusión transcripcional *lacZY*, fue cuantificada espectrofotométricamente como se describió anteriormente (Miller J.H. 1972; Putnam S.L. y A.L. Koch, 1975). La actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa expresada en Unidades Miller y normalizada por la densidad bacteriana ( $DO_{600}$ ), se calculó utilizando la ecuación  $[(A_{420}-1.75 \times A_{550}) \times 1000] / [\text{tiempo de reacción (min)} \times \text{volumen de cultivo (ml)} \times DO_{600}]$ . Cada muestra se analizó por triplicado de tres experimentos independientes.

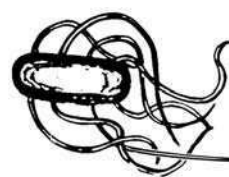
## 9. Análisis de proteínas

Las fracciones totales de membrana fueron preparadas de células cultivadas en LB y recolectadas a una  $DO_{600}$  de 1 como se describió previamente (Marolda C.L. y col., 2008). Se mezclaron las muestras con colorante de rastreo para proteínas 3x (*3x protein tracking dye*), incubadas por 30 min. a 45 °C, separadas en un gel 14 % SDS-PAGE, y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La misma membrana se incubó con anticuerpos policlonales anti-Wzz purificado de conejo (Marolda C.L. y col., 2008) y anticuerpo monoclonal anti-Flag (Sigma). Las bandas de reacción se detectaron por fluorescencia con el sistema de imagen Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor Biosciences) usando anticuerpos anti-conejo Rockland, Pennsylvania) y anticuerpos anti-ratón Alexa Fluor 680 (Molecular Probes). El análisis densitométrico se realizó usando el *software* Odyssey e imágenes digitales de membrana, las cuales fueron incubadas simultáneamente con ambos anticuerpos anti-Wzz y anti-Flag. Esto resultó en bandas de proteínas con dos colores fluorescentes y dado que el anticuerpo anti-Flag posee reacción cruzada con una proteína de membrana desconocida de expresión constitutiva, usamos la densidad de pixeles de la banda de esta proteína como un estándar interno de carga para la normalización.

## 10. Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

Se realizó una Q-RT-PCR a tiempo real para semicuantificar y comparar los niveles de transcripto del gen de interés en la cepa mutante  $\Delta dam$  con respecto a la cepa salvaje. Para ello, las bacterias se cultivaron a 37 °C en agitación en medio LB hasta una  $DO_{600}$

de 0.6. Las células se lisaron y el ARN total se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Inc) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN contaminante se digirió con DNasa libre de ARN (RNase-Free DNaseI, Epicentre Biotechnologies), y la pureza del ARN aislado se confirmó realizando una reacción de PCR usando *primers* específicos para ARNr *16s* (q-16s-F y q-16s-R, Tabla 4. 4). La concentración y la pureza de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm / 280 nm. Luego de la inactivación de la DNasa, el ARN (1 µg) se usó como templado para la reacción de retrotranscripción o transcripción reversa (RT-PCR). Para esto, el ADN complementario o ADNc se sintetizó con hexámeros de *primers* generados al azar (*random hexamer primers*, Invitrogen), dNTPS y Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen). La Q-RT-PCR (del inglés *Quantitative-Real Time-Polimerase Chain Reaction*) se realizó con el par de *primers* apropiados, ADNc y Mezcla Real (Biodynamics) la cual que contiene nucleótidos, polimerasa, *buffer* de reacción y colorante verde (*Green dye*), usando el termociclador detector Rotor-Gene 6000 Real Time PCR (Corbett Research). El ciclo de amplificación consistió de una fase mantenida por 3 min. a 95 °C seguida de 40 ciclos a 95 °C por 20 seg. 60 °C por 30 seg. y 72 °C por 20 seg. Se utilizó el par de *primers* q-wzz-F y q-wzz-R para *wzz*; pmrA-F y q-pmrA-R para *pmrA*; q-rcsB-F y q-rcsB-R para *rcsB*; y q-16s-F y q-16s-R para *16s* (Tabla 4. 4). Para el análisis de la expresión génica relativa se aplicó el método comparativo de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Livak K.J. y T.D. Schmittgen 2001). El número de copias de cada muestra transcripta se determinó con la ayuda del *software* perteneciente al termociclador. Brevemente, primero se midió la eficiencia de amplificación para cada par de *primers* pertenecientes a los genes de interés y al ARNr *16s*. Luego, se determinó el  $C_T$  de cada muestra y se normalizó por la cantidad de templado agregado por comparación relativa al gen de ARNr *16s* (control endógeno o normalizador). Estos valores normalizándose ( $\Delta C_T$ ) se normalizaron nuevamente en forma relativa a la muestra de la cepa salvaje (calibrador) obteniéndose el valor de la expresión relativa ( $\Delta\Delta C_T$ ). Por lo tanto, los resultados son relativos a la muestra del calibrador, al cual se le adjudica el valor de uno.



*Referencias  
Bibliográficas*

---

## Referencias bibliográficas

- Balbontín, R., G. Rowley, M. G. Pucciarelli, J. López-Garrido, Y. Wormstone, S. Lucchini, F. García-Del Portillo, J. C. Hinton y J. Casadesús. 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **188**:8160-8168.
- Bastin DA, Stevenson G, Brown PK, Haase A, Reeves PR.. 1993. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol Microbiol.* **7(5)**:725-34.
- Braaten, B. A., J. V. Platko, M. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo y D. A. Low. 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the pap and fan pili operons in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4250-4254.
- Beutler, B y E. T. Rietschel. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* **3(2)**:169-76.
- Burns, S. M. y S. I. Hull. 1998. Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect Immun.* **66(9)**:4244-53.
- Cohen, S. N., A. C. Chang y L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:2110-2114.
- Collins, L. V. Y J. Hackett. 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the rfc gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **173(8)**:2521-9.
- Coughlin, R. T., S. Tonsager y E. J. McGroarty. 1983. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **22(8)**: p. 2002-7
- Daniels, C. y R. Morona. 1999. Analysis of *Shigella flexneri* wzz (Rol) function by mutagenesis and cross-linking: wzz is able to oligomerize. *Mol Microbiol.* **34(1)**:181-94.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:6640-6645.
- Delgado, M. A., C. Mouslim y E. A. Groisman. 2006. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol. Microbiol.* **60**:39-50.
- Ellermeier, C. D., A. Janakiraman y J. M. Slauch. 2002. Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated sitespecific recombination in bacteria. *Gene* **290**:153-161.
- Erridge, C., E. Bennett-Guerrero y I. R. Poxton. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **4(8)**: p. 837-851.
- Ernst, R. K., T. Guina y S. I. Miller. 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. Review. *Microbes Infect.* **3(14-15)**:1327-34.
- Fälker, S., J. Schilling, M. A. Schmidt y G. Heusipp. 2007. Overproduction of DNA adenine methyltransferase alters motility, invasion, and the lipopolysaccharide O-antigen composition of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **75**:4990-4997.

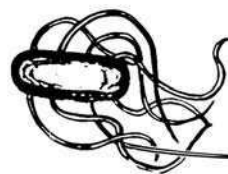
- Frirdich, E., B. Lindner, O. Holst y C. Whitfield.** 2003. Overexpression of the *waaZ* gene leads to modification of the structure of the inner core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface. *J. Bacteriol.* **185**: 1659–1671.
- Grossman, N., M. A. Schmetz, J. Foulds, E. N. Klima, V. Jiminez, L. L. Leive, and K. A. Joiner.** 1987. Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella montevideo*. *J. Bacteriol.* **169**:856-863.
- Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett y S. I. Miller.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science.* **11;276(5310)**:250-3.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon, y C. Whitfield.** 1998a. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**:221-232.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon, P. A. Amor y C. Whitfield.** 1998b. The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific beta-glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **6**:29497-29505.
- Hitchcock, P. J., T. M. Brown.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277.
- Hoare, A., M. Bittner, J. Carter, S. Alvarez, M. Zaldivar, D. Bravo, M. A. Valdano y I. Contreras.** 2006. The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect. Immun.* **74**:1555-1564.
- Hornef, M. W., M. J. Wick, M. Rhen y S. Normark.** 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Review. *Nat Immunol* **3(11)**:1033-40.
- Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**: 408-410.
- Joiner, K. A.** 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: p. 201-230
- Kato, A. y E. A. Groisman.** 2004. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Gene Dev.* **18**:2302-2313.
- Keenleyside, W. J., M. Perry, L. Maclean, C. Poppe y C. Whitfield.** 1994. A plasmid-encoded *rfbO*:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Mol Microbiol.* **11(3)**:437-48.
- Koop A. H., M. E. Hartley y S. Bourgeois.** 1987. A low-copy-number vector utilizing beta-galactosidase for the analysis of gene control elements. *Gene.* **52**:245-256.
- Kox, L. F., M. M. Wösten y E. A. Groisman.** 2000. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J.* **19**:1861-1872.
- Lahteenmaki, K., P. Kyllonen, L. Partanen y T. K. Korhonen.** 2005. Antiprotease inactivation by *Salmonella enterica* released from infected macrophages. *Cell. Microbiol.* **7**: 529–538.
- Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner y M. A. Apicella.** 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods.* **126**:109-117.

- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
- Lüderitz, T., K. Brandenburg, U. Seydel, A. Roth, C. Galanos, y E. T. Rietschel.** 1989. Structural and physiochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J.Biochem.* **179**: 11-16.
- Łyżeń, R., G. Wegrzyn, A. Wegrzyn y A. Szalewska-Palasz.** 2006. Stimulation of the lambda pR promoter by Escherichia coli SeqA protein requires downstream GATC sequences and involves late stages of transcription initiation. *Microbiology* **152**:2985-2992.
- Marino, P. A., B. C. McGrath y M. J. Osborn.** 1991. Energy dependence of O-antigen synthesis in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **173**:3128-3133.
- Marinus, M. G.** 1985. DNA methylation influences trpR promoter activity in Escherichia coli. *Mol Gen Genet.* **200**: 185–186.
- Marolda, C. L., J. Welsh, L. Dafoe y M. A. Valvano.** 1990. Genetic analysis of the O7-polysaccharide biosynthesis region from the *Escherichia coli* O7:K1 strain VW187. *J. Bacteriol.* **172**:3590-3599.
- Marolda, C. L., E. R. Haggerty, M. Lung y M. A. Valvano.** 2008. Functional analysis of predicted coiled-coil regions in the *Escherichia coli* K-12 O-antigen polysaccharide chain length determinant Wzz. *J. Bacteriol.* **190**:2128-37.
- McGrath, B. C. y M. J. Osborn.** 1991. Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **173**:649-654.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 352–355.
- Mulford, C. A. y M. J. Osborn.** 1983. An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of Salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**:1159-1163.
- Murata, T., W. Tseng, T. Guina, S. I. Miller y H. Nikaido.** 2007. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **189**:7213-7222.
- Murray, G. L., S. R. Attridge y R. Morona.** 2003. Regulation of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol. Microbiol.* **47**:1395-1406.
- Murray, G. L., S. R. Attridge y R. Morona.** 2005. Inducible serum resistance in *Salmonella* Typhimurium is dependent on wzz(fepE)-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect.* **7**:1296-1304.
- Murray, G. L., S. R. Attridge y R. Morona.** 2006. Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J. Bacteriol.* **188**:2735-2739.
- Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and drug efflux. *Science* **264**, 382–8.
- Osborn, M. J.** 1963. Studies in the Gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**:499-506.
- Phalipon, A., C. Costachel, C. Grandjean, A. Thuizat, C. Guerreiro, M. Tanguy, F. Nato, B. Vulliez-Le Normand, F. Belot, K. Wright, V. Marcel-Peyre, P. J. Sansonetti, L. A. Mulard.** 2006. Characterization of functional oligosaccharide mimics of the *Shigella flexneri* serotype 2a O-antigen: implications for the

- development of a chemically defined glycoconjugate vaccine. *J. Immunol.* **176**:1686-1694.
- Polaczek, P., K. Kwan y J. L. Campbell.** 1998. GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N<sup>6</sup>-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Mol Gen Genet.* **258**: 488-493.
- Popoff, M. Y. y L. Le Minor.** 1985. Expression of antigenic factor O:54 is associated with the presence of a plasmid in Salmonella. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **136B(2)**:169-79.
- Putnam, S. L. y A. L. Koch.** 1975. Complication in the simplest cellular enzyme assay: lysis of *Escherichia coli* for the assay of B-galactosidase. *Anal. Biochem.* **63**:350-360.
- Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent y R. E. Bishop.** 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:295-329.
- Raetz, C. R. H. Y C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:635-700.
- Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Curtiss, Ingraham, Lin *et al.*, Washington, DC: American Society Microbiology Press. pp 1035-1063.
- Riva, A., M. O. Delorme, T. Chevalier, N. Guilhot, C. Hénaut y A. Hénaut.** 2004. The difficult interpretation of transcriptome data: the case of the GATC regulatory network. *Comput Biol Chem.* **28**:109-118.
- Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**, 355.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandlin, R. C., M. B. Goldberg y A. T. Maurelli.** 1996. Effect of O side-chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol.* **22(1)**:63-73.
- Sandlin, R. C., K. A. Lampel, S. P. Keasler , Goldberg M. B., A. L .Stolzer y A. T. Maurelli .** 1995 Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infect Immun.* **63(1)**:229-37.
- Schagger, H. y G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**:368-379.
- Schnaitman, C. A. y J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.
- Snavely, M. D., S. A. Gravina, T. T. Cheung, C. G. Miller y M. E. Maguire.** 1991. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. *J. Biol. Chem.* **266**:824-829.
- Torreblanca, J., S. Marques, J. Casadesus.** 1999. Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. *Genetics* **152**:31-45.
- Valvano, M. A.** 2003. Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front. Biosci.* **8**:s452-471.
- Van den Bosch, L., P. A. Manning y R. Morona.** 1997. Regulation of O-antigen chain length is required for *Shigella flexneri* virulence. *Mol Microbiol.* **23(4)**:765-75.



- Weiss, J., M. Hutzler y L.Kao.** 1986. Environmental modulation of lipopolysaccharide chain length alters the sensitivity of *Escherichia coli* to the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein. *Infect Immun.* **51(2):**594-9.
- Whitfield C, Amor PA, Köplin R.** 1997. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. Review. *Mol Microbiol.*;23(4):629-38.
- Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3:**178-185.
- Whitfield, C. y M. A. Valvano.** 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35:**135-246.



*Futuro*

---

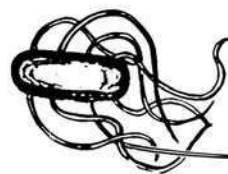
## Futuro

Sobre la base de los resultados obtenidos en esta Tesis, nuevos objetivos se plantean para el futuro.

Se continuará el análisis de la participación de la enzima Dam en la síntesis del LPS en *S. Enteritidis*. En este sentido, se profundizará el estudio de la expresión de los genes *pmrA* y *rcsB*. A su vez, los estudios se realizarán en *S. Typhimurium*, comenzando por el estudio del patrón del LPS.

Por otro lado, resulta interesante analizar la composición química del antígeno O de la mutante *SE $\Delta$ dam*, como así también la del lípido A. Este trabajo será desarrollado por una nueva integrante de nuestro grupo que formará parte del plan de doctorado.

El alcance de estos objetivos nos permitirá comprender las bases moleculares de la atenuación y/o protección conferida por cepas *dam* de *Salmonella enterica*. contribuirá al conocimiento de la regulación de la síntesis del LPS, uno de los principales antígenos de superficie, requerido tanto para la virulencia de la bacteria como para la iniciación de una respuesta inmune.



*Conclusión*  
*General*

---

## Conclusión General

A lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral investigamos las características de cepas *dam* de *S. Enteritidis*. Encontramos que a diferencia de las cepas *dam* *S. Typhimurium*, la mutante *SEΔdam* produce en el macrófago una respuesta inflamatoria menor que la que induce la cepa salvaje. Este hecho, podría ser explicado por una disminución de la síntesis y secreción de proteínas efectoras como *SopA* y *SopB*. El hallazgo de una reducción significativa en la expresión de *sopA* y *sopB* en la mutante *SEΔdam* demuestra que *Dam* regula también la expresión de genes de virulencia ubicados fuera de la SPI-1.

Demostramos también en este trabajo que la síntesis del LPS de *Salmonella* está regulada por la metilación por *Dam*. La ausencia de esta proteína afecta el largo de cadena del antígeno O. La importancia de este hallazgo radica en que, contribuimos al conocimiento sobre la síntesis del LPS en *Salmonella*. A su vez, un defecto en la síntesis del antígeno O explicaría la atenuación observada en la mutante *SEΔdam* y también el fracaso en la generación de inmunidad protectora.

Numerosos estudios de cepas vacuna mutantes en el gen *dam* han sido llevados a cabo en *Salmonella*. En particular, las cepas de serovariedad *Typhimurium*, carentes del gen *dam*, mostraron ser altamente atenuadas y protectoras. A partir de estos trabajos y junto al hecho de que el gen *dam* es altamente conservado entre especies, se difundió el concepto de que la mutación del gen *dam* es una estrategia universal para la construcción de cepas vacuna en Enterobacterias. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran, sin embargo, que en la serovariedad *Enteritidis*, la delección del gen *dam* genera cepas sin capacidad protectora. Por lo tanto, la extrapolación de los resultados obtenidos en mutantes *dam* *S. Typhimurium* a otras especies o incluso dentro de una misma especie bacteriana, debería ser cuidadosamente evaluada.