



**UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA**

Tesis entregada a la Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, para optar grado de Magíster en Bioquímica y al título de Bioquímico.

**La pseudogenización del regulador transcripcional  
MarT, contribuye a la patogenicidad de *Salmonella*  
Typhi.**

SEBASTIÁN ANDRÉS JEREZ NAVARRETE

SANTIAGO – CHILE

2017



**UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA**

**“La pseudogenización del regulador transcripcional  
MarT, contribuye a la patogenicidad de *Salmonella*  
Typhi.”**

“Trabajo de titulación presentado a la Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello en cumplimiento de los requisitos exigidos para optar al grado de Magíster en Bioquímica y al título profesional de Bioquímico”.

Por

**SEBASTIÁN ANDRÉS JEREZ NAVARRETE**

Director de Tesis: Dr. Guido Mora Longa

Co-Director de Tesis: Dr. Nicolás Villagra Marín

Laboratorio de Patogénesis Molecular y Antimicrobianos, Facultad de Medicina,  
Universidad Andrés Bello

**SANTIAGO – CHILE**  
**2017**



**UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA**

**“La pseudogenización del regulador transcripcional MarT,  
contribuye a la patogenicidad de *Salmonella Typhi*.”**

**SEBASTIÁN ANDRÉS JEREZ NAVARRETE**

Esta Tesis fue elaborada bajo la supervisión del director de Tesis Dr. Guido Mora y el co-director Dr. Nicolás Villagra en el laboratorio de Patogénesis Molecular y Antimicrobianos de la Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión de Seguimiento y Evaluación.

---

Guido Mora Longa, Ph.D  
Director(a) Tesis

---

Nicolás Villagra Marín, Ph.D  
Co-director(a) Tesis

---

Daniel Aguayo Villegas, Ph.D  
Comisión de Tesis

---

Daniel Paredes Sabja, Ph.D  
Comisión de Tesis

**SANTIAGO – CHILE**  
**2017**

## **FINANCIAMIENTO**

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Patogénesis Molecular y Antimicrobianos de la Facultad de Medicina de la Universidad Andrés Bello y fue financiada por el proyecto FONDECYT N°1151393. "LOSS OF KEY FUNCTIONS DRIVES *Salmonella* Typhi ADAPTIVE PATHOGENESIS TO HUMANS".

## DEDICATORIA

*Soli Deo Gloria*

## AGRADECIMIENTOS

No tengo otra forma de partir, si no es agradeciendo primero que todo a Dios por haberme sustentado en todo este tiempo y ayudarme a llegar hasta este punto.

Quiero agradecerle también a mi familia, que ha sido el sustento fundamental en todos estos años, tanto económica como emocionalmente. Gracias papá por todo tu apoyo, gracias mamá por hacerme sentir siempre el hombre más inteligente de este planeta jajajaja... gracias Ricardo, porque a pesar de que no tienes absolutamente ninguna obligación conmigo estuviste dispuesto a prestarme tu ayuda siempre que lo necesité y, además, porque estuviste dispuesto a quererme como a un hijo.

Gracias hermana por aguantarme y gracias al par de torbellinos de la casa Lucas y Annaís.

La alegría que me entregan es una gran motivación para seguir adelante.

Agradezco también a todo el MoraLab. Partiendo por el Doc por haberme recibido en el lab y darme la oportunidad de trabajar aquí, además de depositar una gran confianza en mí cuando lo ameritó.

Gracias también a mi co-director Nicolás Villagra, porque siempre estuvo dispuesto a escuchar, y a prestarme ropa cuando fue necesario. Valoro mucho todo su apoyo a lo largo de mi estadía en el MoraLab.

A mi tutor no reconocido el doctor Hidalgo jajaja... Profe Jano, muchas gracias por su buena onda, su buena disposición, por ayudarme con sus conocimientos. Espero poder tutearlo después de defender.

La verdad es que, como jefes directos, uds con su manera de ser (profe Jano y profe Nico) hacen que el trabajo y el tiempo invertido en el lab se disfrute de verdad.

A todo el equipo del MoraLab, en especial a los más cercanos: Ana, Aracely, Mara, Nuria, al Víctor y por supuesto, a Don Vitoco. Muchas gracias por hacer del laboratorio un ambiente agradable para trabajar. Gracias por las risas, los consejos técnicos y los buenos momentos. Todos ustedes hacen del lab un lugar para que se disfrute el trabajo.

Gracias a los profesores integrantes de mi comisión, los doctores Aguayo y Paredes, por su voluntad y disposición a corregirme y contribuir enormemente en el mejoramiento de este escrito. Espero que el producto final esté a la altura de lo que ustedes esperaban.

A mis grandes amigos de la vida, mi piño querido. Poti, Eve, Tonwa, JP, Felipe, Toy y Nak. Muchas gracias por la hermandad que hemos construido y que ha sido un gran sostén en mi vida desde que los conozco. Gracias por los fines de semana de risas, de conversaciones, de burlas, de esa junta que tanto esperamos en la semana. Los amo cabros.

¿Y cómo no agradecerte a ti? Mi polola, mi novia, mi futura esposa, mi wali. La motivación principal para seguir adelante con todo este proceso. Claudia, te amo profundamente y te agradezco enormemente por todo el tiempo que me has acompañado a lo largo de esta etapa. Sin ti, sin tu apoyo, sin tus consejos y tus retos nada de esto hubiese sido posible. Tú y nuestro próximo matrimonio son el motor y la principal motivación para haber alcanzado con éxito todo esto. Te amo y gracias por estar ahí siempre. Sé que seguiremos viviendo cosas importantes y estaremos ahí el uno para el otro dándonos fuerzas y amor mutuamente.

Mis más profundos y sinceros agradecimientos a todos ustedes.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE GENERAL .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN.....	XI
SUMMARY .....	XIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	8
2. MATERIALES .....	10
2.1. Reactivos.....	10
2.2. Material Biológico .....	11
2.3. Plásmidos .....	12
2.4. Partidores .....	13
2.5. Cultivos bacterianos.....	14
3. MÉTODOS .....	15
3.1. Ensayos <i>in silico</i> .....	15
3.2. Técnicas de Biología Molecular .....	16
3.3. Generación de mutantes de <i>Salmonella</i> Typhi y <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	20
3.4. Ensayo de motilidad.....	23
3.5. Ensayo de infección <i>in vitro</i> .....	23
3.6. Ensayo de infección en modelo murino. ....	24
3.7. Análisis estadísticos. ....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Identificación de posibles genes blanco de <i>marT</i> en <i>Salmonella</i> Typhi. ....	26
4.2. Validación de posibles genes blanco de <i>marT</i> . ....	31
4.3. Caracterización fenotípica de STY1408 <i>in vitro</i> .....	33



4.4.	Determinación de la participación de STY1408 en virulencia <i>in vivo</i> . .....	39
5.	DISCUSIÓN .....	44
5.1.	Genes blanco de MarT .....	44
5.2.	Caracterización de STY1408. ....	46
5.3.	MarT está involucrado en la motilidad de <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	48
5.4.	Regulón de MarT. ....	51
6.	CONCLUSIÓN.....	52
7.	REFERENCIAS .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Porcentaje de pseudogenes presentes en los genomas de distintas bacterias. ....	3
Figura 2.- Organización genética y porcentaje de identidad de genes de SPI-3.....	4
Figura 3.- Análisis de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes blanco reportados. ....	28
Figura 4.- Filtro de genes candidatos blanco según orientación <sup>a</sup> , distancia <sup>b</sup> y número <sup>c</sup> de la secuencia consenso presente en la caja promotora .....	29
Figura 6.- Nivel de expresión de genes candidatos blanco de <i>marT</i> . ....	32
Figura 7.- Esquema de la cascada de fosforilaciones controlada por quimiorreceptores de la familia MCP.....	33
Figura 8.- Obtención de cepas mutantes STY1408 en STM y STY .....	35
Figura 9.- Participación de STY1408 en motilidad .....	36
Figura 10.- Participación de <i>marT</i> en la motilidad de STM y STY.....	37
Figura 11.- Participación de STY1408 en infección <i>in vitro</i> en células epiteliales HEp-2 ..	38
Figura 12.- Evolución de peso de ratones postinfección oral .....	40
Figura 13.- Participación de STY1408 en infección oral <i>in vivo</i> en ratones .....	41
Figura 14.- Infección intraperitoneal de ratones .....	42
Figura 15.- Participación de <i>marT</i> en infección oral <i>in vivo</i> en ratones .....	43
Figura 16.- Modelo de regulación lisina dependiente de CadC sobre el operon <i>cadBA</i> .....	49
Figura 17.- Predicción de segmentos transmembrana de CadC y MarT. ....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. ....	11
Tabla 2.- Líneas celulares utilizadas en este trabajo. ....	11
Tabla 3.- Plásmidos utilizados en este trabajo. ....	12
Tabla 4.- Partidores utilizados en este trabajo. ....	13
Tabla 5.- Clasificación de genes candidatos blanco según ubicación y distancia de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes. ....	27
Tabla 6.- Genes candidatos blanco finales. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
Amp <sup>R</sup>	Resistencia a ampicilina
Cam	Cloranfenicol
Cam <sup>R</sup>	Resistencia a cloramfenicol
Kan	Kanamicina
Kan <sup>R</sup>	Resistencia a kanamicina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxinucleótidostrifosfatos
ORF	Marco abierto de lectura ( <i>open Reading frame</i> )
LB	Luria Bertani
OD	Densidad óptica ( <i>optical density</i> )
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600nm ( <i>optical density</i> )
pb	Pares de bases
nt	Nucleótidos
aa	Aminoácidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> ( <i>Salmonella pathogenicity island</i> )
CFU	Unidades Formadoras de Colonias ( <i>colony forming unit</i> )
STM	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
STY	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi
MOI	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of infection</i> )

FBS	Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
PBS	<i>Buffer salino fosfato (Phosphate buffered saline)</i>
O.N.	Toda la Noche ( <i>Over night</i> )
ORF	Marco de lectura ( <i>open reading frame</i> )
$\Psi$	Pseudogén
$\Delta$	Mutante por delección
::	Inserción

## RESUMEN

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (STM) es considerado un patógeno generalista ya que infecta aves, ratones y humanos. Por otro lado, *Salmonella enterica* serovar Typhi (STY) es considerado un patógeno de hospedero restringido que sólo infecta al ser humano. A pesar de estas diferencias STM y STY comparten un 97% de identidad entre los genes que comparten. La transferencia horizontal y la pérdida de material genético han sido esenciales para la diferenciación de ambos serovares. La isla SPI-3 es un ejemplo del resultado de estos dos procesos. SPI-3 codifica – entre otros genes - para *misL* y *marT*. En STM, *misL* es requerido para la colonización intestinal de aves y ratones infectados oralmente. Además, se ha reportado que MarT regula positivamente a *misL* en STM, de manera directa mediante el reconocimiento de la secuencia consenso TNAAANNNNTNAAA en su promotor. Por otra parte, en STY existen genes de SPI-3 que se encuentran como pseudogenes (*marT* es uno de ellos); mientras que otro marco de lectura, como es el caso de *surV* (que está involucrado en la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) está presente sólo en STY. Es interesante que la expresión heteróloga de *marT*<sub>STM</sub> en STY regula negativamente a *surV*, a nivel transcripcional. Además, análisis transcriptómicos de STM al interior de macrófagos muestran que la expresión de *marT* incrementa 10 veces, reforzando la idea de que este gen está involucrado en la virulencia de STM. Por estas razones, el objetivo de este trabajo es encontrar y caracterizar nuevos genes regulados por MarT. Con este propósito, se realizó una búsqueda global *in silico* de la secuencia TNAAANNNNTNAAA para identificar posibles blanco de MarT. Una vez seleccionados y validados esos genes, se confirmó que MarT está involucrado en una regulación negativa de STY1408, un gen con 98% de identidad a quimiorreceptores de la familia MCPs. Ensayos en placas de agar semisólido muestran que

STY1408 está involucrado en motilidad tanto en STM como en STY. Infecciones de células HEp-2 con STM y STY mutantes en el gen STY1408 muestran un defecto en invasión, mientras que infecciones orales en ratón con mutantes nulas de STY1408 en STM son defectuosas para colonizar hígado y bazo. Con esto, se concluye que MarT participa en la regulación negativa de STY1408, un gen involucrado en la virulencia de *Salmonella enterica*.

## SUMMARY

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (STM) is considered a generalist pathogen since it infects birds, mice and humans. On the other hand, *Salmonella enterica* serovar Typhi (STY) is considered a restricted host pathogen that only infects humans. Despite these differences, STM and STY share a 97% of identity between their shared genes. The horizontal transfer and the loss of genetic material have been essentials for differentiation of both serovars. The genomic island SPI-3 is an example that arose as a product of these two processes. SPI-3 encodes – between others genes – for *misL* and *marT*. In STM, *misL* is required for gut colonization of birds and mouse, orally infected. Furthermore, it has been reported that MarT positively regulates *misL* in STM, in a direct manner by recognizing the consensus sequence TNAAANNNNTNAAA on its promoter. On the other hand, in STY there is genes of SPI-3 that are found as pseudogenes (*marT* is one of these); while other ORF, as is the case for *surV* (that is involved in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance) is only present in STY. Interestingly, the heterologous expression of *marT*<sub>STM</sub> in STY negatively regulated *surV*, at the level of transcription. In addition, transcriptomics analysis of STM inside of macrophage shows that *marT* expression increase 10 folds, reinforcing the idea that this gene is involved in the virulence of STM. For these reasons, the objective of this work is to find and characterize new genes regulated by MarT. With this propose, we did a global in silico search of the TNAAANNNNTNAAA sequence to identify possible MarT targets. Once selected and validated these genes, it was confirmed that MarT is involved in negatively regulates expression of STY1408, a gene with 98% of identity to chemoreceptors in the MCP family. Semisolid plate assays shown that STY1408 is involved in motility of STM and STY.



Infection of HEp-2 cells with STM and STY mutant in STY1408 gene show a defect in invasion. Oral infection of mice with STY1408 null STM are defective to colonize liver and spleen. We conclude that MarT is involved in negatively regulates STY1408 gen involved in the virulence of *Salmonella enterica*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Las bacterias pertenecientes a la especie *bongori* son capaces de infectar animales de sangre fría, mientras que la especie *enterica* infecta animales de sangre caliente. Esta última especie, se divide a su vez en 6 subespecies, dentro de las cuales se encuentra la subespecie *enterica*, que comprende los serovares Typhimurium (STM) y Typhi (STY) (Boyd, *et al.* 1993) de particular interés para este trabajo de tesis.

STM es considerado un patógeno generalista, capaz de infectar un amplio rango de hospederos que incluye tanto aves, ratones como también seres humanos. En ratones, STM es capaz de producir un cuadro similar a la fiebre tifoidea del humano, una enfermedad sistémica de carácter mortal. En el hospedero humano el serovar Typhimurium produce sólo una gastroenteritis autolimitante, normalmente sin infección sistémica.

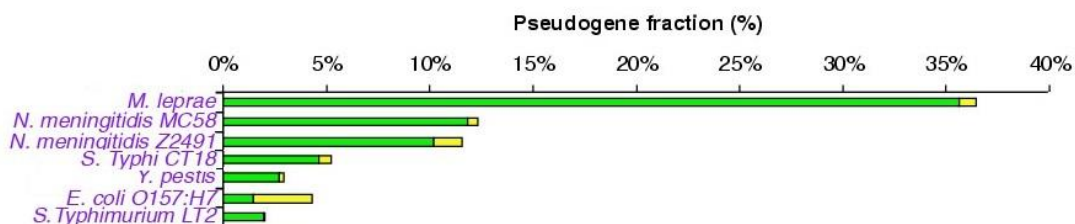
Por su parte STY es considerado un patógeno especialista o de hospedero restringido, ya que sólo es capaz de infectar al ser humano, en el cual produce una enfermedad sistémica similar conocida como Fiebre Tifoidea, la cual puede tener consecuencias mortales en caso de no ser tratada adecuadamente. Sin embargo, y a pesar de estas grandes diferencias en el rango de hospedero y la patogenicidad de ambos serovares, STM y STY poseen alrededor de un 97% de identidad entre los genes que comparten, es decir, los genes que

se encuentran presentes en ambos serovares son prácticamente idénticos (McClelland, *et al.* 2001; Parkhill, *et al.* 2001).

A pesar de ser bacterias con un alto porcentaje de identidad genética entre los genes que comparten, estas poseen grandes diferencias en términos de patogenicidad tal como se mencionó anteriormente. Dichas diferencias a nivel genético pueden estar dadas por la adquisición de nuevos genes (transferencia horizontal). Un claro ejemplo de esto son las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI), dentro de las cuales se encuentra, por ejemplo, SPI-18, segmento genómico de 2.3 kb, la cual se encuentra presente en STY y ausente en el serovar Typhimurium. Dentro de SPI-18 se encuentra codificada la hemolisina HlyE, un factor de virulencia que al ser expresado heterológamente en STM aumenta la colonización de órganos profundos en ratones (Fuentes, *et al.* 2008).

Otro proceso que contribuye a la diferencia entre los serovares Typhi y Typhimurium es la pérdida de genes, la cual puede estar dada por mutaciones, inserciones (de un solo nucleótido o elementos como transposones) o deleciones. Bajo este contexto de pérdida genética encontramos la pseudogenización, en la cual la interrupción de un gen producida por un rearrreglo genético o bien una mutación puntual produce una pérdida en la función del gen (Arber W. 2000). Dicho proceso pareciera tener una relación directa con la especificidad de hospedero de ciertos patógenos, tal como lo muestra la Figura 1, en la cual podemos observar que STM siendo un patógeno generalista posee un porcentaje menor al 3% de su genoma total pseudogenizado, mientras que STY – un patógeno de hospedero restringido - posee alrededor de un 6% de pseudogenes en su genoma. Por otra parte, encontramos ejemplos tales como *Mycobacterium leprae* que posee un porcentaje 36% aproximadamente (Liu, *et al.* 2004) (Figura 1). Esta última, es un ejemplo

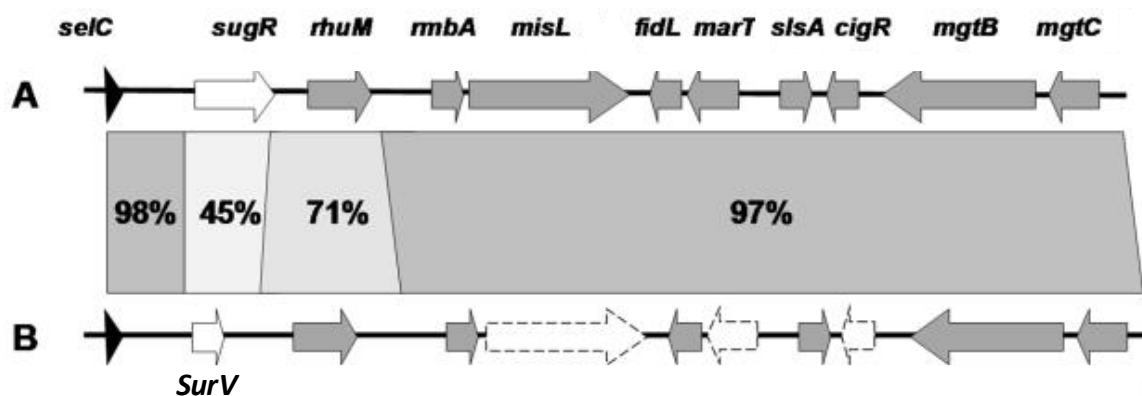
de un patógeno intracelular obligado, reforzando la especulación de que la cantidad de pseudogenes presentes parece tener una relación directa con la restricción de hospedero y el ambiente en el que puede vivir un patógeno. Además, también sustenta que el proceso de pérdida de genes ha contribuido a las diferencias patogénicas entre STM y STY.



**Figura 1.- Porcentaje de pseudogenes presentes en los genomas de distintas bacterias.** (Modificado de Liu, *et al.* 2004)

Si bien tanto la adquisición como la pérdida de genes han contribuido por separado a la diferenciación entre los serovares Typhi y Typhimurium, en los últimos años se ha demostrado que también es posible encontrar una combinación de ambos mecanismos en esta diferenciación. Un claro ejemplo de esto es SPI-3, la cual consiste en un segmento genómico de 17 kb localizado en el locus *selC* y que contiene 10 genes totalmente funcionales en STM (Blanc-Potard *et al* 1999).

SPI-3 se encuentra presente tanto en STM como en STY, sin embargo, en el serovar Typhi 3 de los 10 genes presentes en SPI-3 de STM se encuentran pseudogenizados (*misL*, *marT* y *cigR*), por lo tanto, las funciones de estos 3 genes se encuentran ausentes en STY. Además, en esta isla el gen *surV* se encuentra presente en STY y no así en STM, tal como se muestra en la Figura 2 (tomada de Retamal *b.* 2010).



**Figura 2.- Organización genética y porcentaje de identidad de genes de SPI-3. A.** SPI-3 de *Salmonella Typhimurium*. **B.** SPI-3 de *Salmonella Typhi*. En gris se muestran los genes compartidos entre ambos serovares. En blanco se muestran los genes exclusivos para cada serovar. Líneas punteadas representan los pseudogenes presentes en el serovar *Typhi*. (Modificado de Retamal, *et al.* 2010).

Uno de los 3 genes funcionales en STM que se encuentran pseudogenizados en STY dentro de SPI-3 es *marT*. Dicho gen codifica para el regulador transcripcional MarT, perteneciente a la familia de proteínas reguladoras ToxR de *Vibrio cholerae*, los cuales se han descrito que son capaces de reconocer la secuencia consenso TNAAANNNNTNAAA en las cajas promotoras de los genes que regulan. Es así, entonces, como MarT es capaz de regular de manera positiva la expresión del gen *misL* al unirse directamente a su caja promotora (Tükel *et al.* 2007), contribuyendo así a la virulencia de STM, dado que *misL* codifica para una adhesina intestinal.

Análisis del transcriptoma de STM han mostrado que la expresión de *marT* se incrementa 10 veces cuando las bacterias están al interior de macrófagos, reforzando la idea de que este gen está implicado en el proceso de virulencia de STM (Eriksson *et al.* 2003). Además, se ha demostrado que *marT* tiene su mayor actividad promotora y expresión en estado de crecimiento estacionario de la bacteria en STM. Además, ensayos *in silico*

sugieren que el dominio de unión a DNA de la proteína MarT abarca desde los aminoácidos número 60 al 180 dentro de su secuencia. Sin embargo, en STY *marT* (*marT<sub>STY</sub>*) presenta 12 sustituciones nucleotídicas comparado con la secuencia *marT* de STM (*marT<sub>STM</sub>*), dentro de las cuales la sustitución G200A produce el primero de 8 codones stop prematuros presentes en *marT<sub>STY</sub>* entre los nucleótidos 198 al 201, produciendo una proteína trunca no funcional de aproximadamente 60 aminoácidos en STY (Ortega *et al.* 2016).

Por otro lado, una expresión heteróloga del gen *marT<sub>STM</sub>* en una cepa STY  $\Delta\Psi$ *marT<sub>STY</sub>* produce una disminución (a diferencia de la regulación positiva ejercida sobre *misL*) en los niveles de mRNA del gen *surV*, el cual está codificado dentro de SPI-3 exclusivamente en STY (Ortega *et al.* 2016). El gen *surV* contribuye a la resistencia a especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), específicamente a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Ortega *et al.* 2016), sugiriendo nuevamente, que *marT* participa de manera indirecta en la virulencia de *Salmonella*. Además, análisis *in silico* muestran que parte de la secuencia consenso reconocida por *marT* se encuentra presente en la caja promotora de *surV* (TNAAA). Esto sustenta la idea de que la pseudogenización de *marT* en STY contribuye a la virulencia de dicha bacteria, dado que al encontrarse pseudogenizado no es capaz de ejercer la regulación negativa sobre *surV* mencionada anteriormente y, por lo tanto, permite que la bacteria pueda resistir las concentraciones de  $H_2O_2$  a las cuales se ve enfrentada al interior de macrófagos en una infección sistémica. Considerando entonces que *marT*: (i) se encuentra pseudogenizado en STY, (ii) ejerce una regulación positiva de la expresión de *misL* por unión directa a su promotor en STM, (iii) una restitución de *marT<sub>STM</sub>* conlleva una regulación negativa en la expresión de *surV*

en STY, (iv) que en ambos casos *marT* está implicado en la regulación de factores de virulencia de estas bacterias y (v) que además es capaz de reconocer la secuencia consenso TNAAANNNTNAAA (o bien TNAAA en el caso de *surV*) es que se propone que *marT* podría actuar como un regulador transcripcional de otros genes involucrados en patogenicidad de STY.

## HIPÓTESIS

La pérdida del gen *marT* produce cambios en la expresión de genes implicados en virulencia de *Salmonella enterica*.



## OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar nuevos genes implicados en virulencia que sufran cambios en su expresión debido a la pérdida del gen *marT* en *Salmonella* Typhi.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 1. Identificar genes blanco de *marT* en *Salmonella* Typhi.

- a) Realizar alineamiento *in silico* entre la secuencia consenso reconocida por *marT* y el genoma de *Salmonella* Typhi.
- b) Determinar orientación, distancia (respecto del nucleótido +1 de la transcripción), número y extensión de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes blanco de MarT conocidos (*misL* y *surV*).
- c) Seleccionar genes blanco candidatos identificados en 1a según los parámetros establecidos en el objetivo 1b.
- d) Cuantificar y confirmar cambios en la expresión de genes candidatos blanco de *marT* en *S. Typhi* heteróloga y *S. Typhimurium* mutante *marT* con respecto a sus cepas silvestres

### 2. Caracterizar fenotípicamente mutantes de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* en el(los) gen(es) identificado(s) en el objetivo 1.

- a) Revisión bibliográfica de gen(es) identificado(s) en el objetivo 1.
- b) Obtener cepas *S. Typhi* y *S. Typhimurium* mutantes en el(los) gen(es) implicado(s) en virulencia identificados en el objetivo específico 1.
- c) Caracterizar el fenotipo *in vitro* asociado a cada uno de los genes mutados.

**3. Determinar la participación en una infección en modelo murino del(los) gen(es) identificado(s) y caracterizado(s) en el objetivo 1 y 2 respectivamente.**

- a) Infeccionar ratones oral e intraperitonealmente con la(s) cepa(s) STM mutante(s) realizadas en el objetivo 2b, comparándola(s) con la cepa STM silvestre.

## 2. MATERIALES

### 2.1. Reactivos

**Reactivos obtenidos de Merck:** Agar-agar, extracto de levadura, peptona de caseína, agua para cromatografía (calidad biología molecular), alcohol isoamílico, cloruro de sodio (NaCl), fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

**Reactivos obtenidos de Invitrogen Life Technologies:** EDTA 0.5 M pH 8,0; agua destilada ultra pura; fenol ultra puro; random hexámeros 50  $\mu\text{M}$ ; transcriptasa reversa Super Script II; dATP 100mM; dCTP 100mM; dGTP 100mM; dTTP 100mM; estándar de peso para DNA 1kb plus DNA ladder y Taq DNA polimerasa.

**Reactivos obtenidos de Gibco Life Technologies:** DMEM 1X (4.5 g/L D-Glucosa, L-Glutamina, 110 mg/L Piruvato de sodio); PBS pH 7.4 1X y 0,25% tripsina-EDTA 1X.

**Reactivos obtenidos de Sigma:** Agar-agar, kanamicina, cloramfenicol, ampicilina

**Reactivos obtenidos de Promega:** DNasa (RQ1), buffer DNasa, solución de stop, kit de extracción para DNA genómico (Wizard® genomic DNA purification kit) y kit de extracción para DNA plasmidial (Wizard®plus SV minipreps DNA purification system)

**Reactivos obtenidos de Winkler:** Alcohol isopropílico, alcohol etílico y cloroformo.

**Reactivos obtenidos de Axygen Bioscience:** Agarosa.

**Reactivos obtenidos de Agilent Technologies:** Brilliant II SYBR green (qPCR master mix) y fluoróforo para control de carga de qPCR ROX.

**Reactivos obtenidos de Ambion Life Technologies:** Acetato de sodio 3M pH 5,5; RNA later ® soln.; RNase away ® reagent; DNasa (Turbo DNasa); buffer turbo DNasa (turbo DNase buffer) y agente inactivador de DNasa (DNase inactivation reagent).

## 2.2. Material Biológico

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

Cepa	Metodología	Resistencia	Origen
<i>Salmonella</i> Typhi 2370	Cepa clínica	S/R	Este Laboratorio
<i>Salmonella</i> Typhi 2370 $\Delta\Psi$ <i>marT::marT</i> <sub>STM</sub>	Intercambio alélico	Cam <sup>R</sup>	Este Laboratorio
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta$ <i>marT::aph</i>	Intercambio alélico	Kan <sup>R</sup>	Este Laboratorio
<i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s	Cepa silvestre	S/R	ATCC
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta$ STM1408:: <i>cat</i>	Intercambio alélico	Cam <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>Salmonella</i> Typhi 2370 $\Delta$ STY1408:: <i>aph</i>	Intercambio alélico	Kan <sup>R</sup>	Este trabajo

Se indica genotipo, metodología utilizada para la construcción de la cepa y resistencia a antibiótico. Kan<sup>R</sup>: resistencia a kanamicina; Amp<sup>R</sup>: resistencia a ampicilina; S/R: sin resistencia.

**Tabla 2.- Líneas celulares utilizadas en este trabajo.**

Línea celular	Origen	Características	Morfología
HEp2	Cáncer cérvico-uterino derivadas HeLa.	Adherentes	Epitelial

Se indica el nombre de la línea celular, su origen, características y morfología.

### 2.3. Plásmidos

**Tabla 3.- Plásmidos utilizados en este trabajo.**

<b>Plásmido</b>	<b>Características</b>	<b>Resistencia</b>	<b>Referencia</b>
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gambetexo</i> pSC101 oriT <sup>S</sup>	Amp <sup>R</sup>	Datsenko and Wanner, 2000
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 oriR6K	Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup>	Datsenko and Wanner, 2000
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 oriR6K	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Datsenko and Wanner, 2000

Se indica el nombre del plásmido, las características, resistencia a antibiótico codificada en cada plásmido y las referencias donde fueron usados estos plásmidos.

## 2.4. Partidores

**Tabla 4.- Partidores utilizados en este trabajo.**

Uso	Nombre	Secuencia 5'-3'	Eficiencia
Mutagénesis STY1408	Wanner STY1408 Fw	ATGTTGAGAAATATCAGCGTCA GGACATGCATTATTCTATTGTA GGCTGGAGCTGCTTCG	N/A
	Wanner STY1408 Rv	TCAGGCCTGGCCGCGCCTGGTG ATGGTCGAAAGAGGTGATCATA TGAATATCCTCCTTAG	N/A
qPCR	mgtB qPCR Fwd	GCACCTTAACCCAGGACAATA	5,2
	mgtB qPCR Rev	CGCTCTGGCTGCTACTATTC	
	STY2718 qPCR Fwd	CCAACTGGCTGGAGATGAATAG	3,9
	STY2718 qPCR Rev	CGCCAGAACGAAGAGATCAA	
	STY1408 qPCR Fwd*	CTTTCTGCACGATCTCCCTATT	3,5
	STY1408 qPCR Rev*	TGCTGCGACCTCTTCAATAC	
	STY0521 qPCR Fwd	TGGAGACACGACAACACATC	4,5
	STY0521 qPCR Rev	AGCAGCGTTCGCAATCT	
	marT 1 qPCR Fwd	GTGTGCGCAAATACGCTTTATC	3,5
	marT 1 qPCR Rev	CTACGCGGAACCGTGATTAT	
	marT 2 qPCR Fwd	GACTTCGCTCAGGCAATAGAA	3,8
	marT2 qPCR Rev	AATGTCCCGGTCATCCAAAG	
	16S qPCR Fw**	TACCTGGTCTTGACATCCAC	N/D
	16S qPCR Rv**	TTATCACTGGCAGTCTCCTT	
	dnaN qPCR Fwd	ACGTCGGCGACTTTATCTTTAC	3,1
dnaN qPCR Rv	GCCCGCTTCCAGATGTTTAT		

Los partidores Wanner STY1408 Fw y Rv hibridan con el plásmido templado pKD3 ó pKD4 (rojo). Además, presentan una extensión de 40 pb de identidad con los extremos del gen blanco para su mutagénesis. Los partidores para qPCR hibridan con regiones intergénicas de los genes blanco, generando un amplicón de 100 pb aproximadamente. \* Estos partidores fueron utilizados para la confirmación genotípica de las mutantes STM  $\Delta$ STM1657::cat y STH  $\Delta$ STY1408::aph.\*\* Estos partidores alinean en el genoma de STM y de STY. N/A No Aplica. N/D No Determinado.

## 2.5. Cultivos bacterianos.

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37°C en aeróbiosis con agitación (200 rpm) constante en caldo Luria-Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L). Este medio de cultivo fue tamponado con buffer fosfato pH 7,0.

Para los cultivos bacterianos en condiciones de microaerofilia, se inocularon 5 mL de caldo LB con 100 µL de bacterias crecidas toda la noche (O.N. por sus siglas en inglés over night), sobre el caldo inoculado se añadió 1 mL aproximadamente de aceite mineral para evitar el intercambio de gases (incluido el oxígeno) en la superficie del caldo de cultivo. Estos cultivos se incubaron a 37 °C sin agitación.

Los cultivos en medio sólido se realizaron adicionando 15 g/L de agar-agar al medio líquido, mientras que para los cultivos en medio semisólido se prepararon placas LB adicionando 3 g/L de agar al caldo. Las cepas que poseían el plásmido pKD46 cuyo origen de replicación es termosensible, se incubaron a 30°C. Para eliminar dicho plásmido, las cepas se crecieron con el antibiótico correspondiente para su selección (distinto a ampicilina) a una temperatura restrictiva para la replicación del plásmido (37°C). Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) 100 µg/ml, kanamicina (Kan) 50 µg/ml, cloranfenicol (Cam) 20 µg/ml.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Ensayos *in silico*.

**3.1.1- Alineamiento.** Utilizando la herramienta online *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul, *et al.* 1990) se alineó la secuencia consenso reportada para el factor de transcripción (TNAAANNNNNTNAAA) contra el genoma de referencia de la cepa de *Salmonella* Typhi CT18. Considerando los nucleótidos degenerados (N) presentes en la secuencia consenso, se alineó la secuencia buscando una identidad de 100% bajo los parámetros de alineamiento clásicos establecidos por BLAST. Los genes candidatos fueron tabulados y clasificados según ubicación, orientación y distancia de la secuencia consenso con respecto al nucleótido +1 de la transcripción y son mostrados en la Tabla 5.

**3.1.2 Selección de genes candidatos.** Se descargó las secuencias de los genes *misL* (Gene ID: 1255281) y *surV* (Gene ID: 1069275) para luego ser analizados en el programa Vector NTI 10.3.0.2 alineando la secuencia consenso TNAAANNNNNTNAAA con un 100% de identidad (considerando los nucleótidos degenerados) se determinó orientación, número, distancia (respecto del +1) y presencia de uno o ambos directos repetidos de la secuencia consenso presente en la caja promotora de estos genes a modo de control positivo. Posteriormente se seleccionaron los genes candidatos que cumplieran con los mismos parámetros de orientación, número, distancia y extensión que los encontrados en los genes *misL* y *surV*.



### **3.2. Técnicas de Biología Molecular**

**3.2.1- Electroforesis en geles de agarosa.** Los geles se prepararon usando agarosa a una concentración de 1 % p/v en *buffer* TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). Las muestras de DNA a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de *buffer* de carga 10x (glicerol 40% v/v, azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, EDTA 0,1 M) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 V constantes durante un tiempo de 60 minutos y luego el gel se tiñó por 10 min en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml). Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

**3.2.2- Extracción de DNA cromosomal.** Se utilizó el kit Wizard<sup>®</sup> genomic DNA purification kit, para todas las extracciones de DNA cromosomal.

**3.2.3- Extracción de DNA plasmidial.** Se utilizó el Kit de miniprep Promega. Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System, para todas las extracciones de plásmido.

**3.2.4- Extracción de RNA.** Se centrifugó 30 mL de cultivo bacteriano en estado estacionario a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió el pellet en 400 µL de *buffer* de lisis (acetato de sodio pH 5,5 18mM; SDS 0,5% p/v; 10 µL de EDTA 1 mM; volumen final de 5 mL). Se agregó 500 µL de fenol ácido previamente incubado a 65°C y se agitó la solución manualmente de forma constante y vigorosa durante 5 minutos, para posteriormente incubarla en hielo por 5 min. Luego se centrifugó la muestra durante 4 min, a una temperatura de 20°C a una velocidad de 14.000 rpm. Se tomó cuidadosamente la fase superior (acuosa) teniendo precaución de no arrastrar la fase inferior, y se traspasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL con 500 µL de una mezcla fenol ácido:cloroformo (1:1). Luego la muestra fue agitada, incubada y centrifugada en las mismas

condiciones mencionadas anteriormente. Nuevamente se tomó la fase acuosa para luego añadirla a un tubo con 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Una vez más la muestra fue agitada, incubada y centrifugada bajo las mismas condiciones. Por último, se tomó la fase superior de la muestra centrifugada y fue traspasada a un tubo eppendorf de 2 mL que contenía 55  $\mu\text{L}$  de una solución de acetato de sodio 3 M a pH 5,5. Para precipitar el RNA, se mezcló la muestra mediante pipeteo y se añadió 1,5 mL de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y luego se dejó a  $-80^{\circ}\text{C}$  O.N. Al día siguiente la muestra fue centrifugada durante 30 min. a una velocidad de 14.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por último, el sobrenadante fue descartado, la muestra fue secada con el tubo abierto bajo campana y mechero durante 15 min y se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de agua L.N (calidad biología molecular).

### **3.2.5- Tratamiento con DNAsa.**

**3.2.5.1- DNasa RQ1 (promega).** La reacción se realizó sobre hielo mezclando 20  $\mu\text{L}$  de RNA, 3  $\mu\text{L}$  de *buffer* DNAsa 10X, 3  $\mu\text{L}$  de DNAsa, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. Luego se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min., se agregó 3  $\mu\text{L}$  solución de *Stop* e incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para análisis de integridad y cuantificación y se traspasaron a un nuevo tubo limpio. El volumen restante se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado posteriormente.

**3.2.5.2- DNasa Turbo (Ambion Life Technologies).** Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de *buffer* Turbo DNAsa 10X, 2  $\mu\text{L}$  de DNasa Turbo (2 U/ $\mu\text{L}$ ) con 40  $\mu\text{L}$  de RNA. Se completó un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de reacción con 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  L.N. Se incubó la muestra durante 60 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se añadió un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de agente inactivador de DNAsa y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. Finalmente se centrifugó la muestra a una velocidad de 10.000 rpm por 1,5 min. Se tomó cuidadosamente la fase superior

y se traspasó a un tubo limpio. Se tomaron 5  $\mu$ L para análisis de integridad y cuantificación y se traspasaron a un nuevo tubo limpio. El volumen restante se guardó congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado posteriormente.

**3.2.6- Integridad de RNA.** Se preparó un gel de agarosa 1% p/v en *buffer* TAE 1X y cloro concentrado 1% v/v. Se mezclaron 3  $\mu$ L de muestra con el volumen adecuado de *buffer* de carga 10X antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a un voltaje de 100 V constantes durante un tiempo de 60 min. Las bandas de RNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

**3.2.7- Cuantificación de RNA.** En placas de micropocillos TAKE 3, se añadieron 2  $\mu$ L de muestra. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm en espectrofotómetro Epoch Biotek. Para esto se utilizó el software Gen 5.1.4.

**3.2.8-Ensayo de transcripción reversa RT-PCR.** La reacción se realizó en hielo mezclando 1  $\mu$ g de RNA tratado con DNAsa, 1 $\mu$ L de random hexámeros 50  $\mu$ M, 1 $\mu$ L dNTP's (10mM) y la cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O L.N para llevar a 13  $\mu$ L de reacción. Se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min. y se enfrió inmediatamente en hielo. Se agregó en hielo 4 $\mu$ L de *Buffer 1st strand 5X* y 2  $\mu$ L de DTT 0,1 M para luego mezclar suavemente con la micropipeta e incubar a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 min. Finalmente se agregó 0,5  $\mu$ L de transcriptasa reversa y se mezcló suavemente con la micropipeta. Se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 min y luego la reacción se inactivó incubando a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 min (Bucarey, Villagra *et al.* 2005). EL cDNA resultante fue diluido 10 veces para ensayos de qPCR posteriores.

**3.2.9- Ensayo de qPCR.** En una micro placa de 48 pocillos se mezclaron 5  $\mu$ L de qPCR master mix SYBR Green, 0,12  $\mu$ L de *primer forward*, 0,12  $\mu$ L de *primer reverse*, 0,07  $\mu$ L de ROX, 1  $\mu$ L de cDNA y 3,69  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O L.N. La reacción de amplificación y cuantificación se realizó en un termociclador Eco de Illumina. El programa utilizado consta de un ciclo de activación de la polimerasa (95°C por 10 min.), 40 ciclos de amplificación (95°C por 30 seg. 60°C por 30 seg y 72°C por 20 seg), un ciclo para obtener la curva de *melting* (95°C por 15 seg 55°C por 15 seg y 95°C por 15 seg) y finalmente una etapa de incubación (50°C por 2 min). El software utilizado para esta técnica fue Eco v4.0.

### **3.2.10- Amplificaciones de PCR.**

**3.2.10.1- Amplificación para mutagénesis.** Se mezcló 5  $\mu$ L de *buffer* 10X, 5  $\mu$ L de *primer forward* (10mM), 5  $\mu$ L de *primer reverse* (10 mM), 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ L de dNTP's (10 mM), 1  $\mu$ L de plásmido templado pKD3 ó pKD4 y 0,5  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (5U/  $\mu$ L). Se completó un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L con 31  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O L.N. La reacción se llevó a cabo en un termociclador en el cual el programa utilizado consistió en un ciclo de denaturación (95°C por 5 min), luego 30 ciclos de amplificación (95°C por 30 seg, temperatura de alineamiento correspondiente a la T<sub>m</sub> de los partidores utilizados por 45 seg, 72°C por un tiempo necesario para la extensión del amplicón, considerenado 1 kb por minuto) y un ciclo de extensión final (72°C por 10 min). El producto de PCR resultante se almacenó a 4°C durante 24 h hasta su uso.

**3.2.10.2- PCR para comprobación genotípica.** Se mezclaron 2,5  $\mu$ L de *buffer* 10X, 2,5  $\mu$ L de *primer forward*, la misma cantidad de *primer reverse*, un volumen de 0,75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>,

0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP's, 5  $\mu\text{L}$  de templado y 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa. Se completó un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con 11  $\mu\text{L}$  de agua L.N. El programa utilizado para la amplificación fue el mismo que el descrito para la amplificación para mutagénesis mencionado anteriormente.

### **3.3. Generación de mutantes de *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium.**

Las mutantes se obtuvieron mediante intercambio alélico entre el gen en estudio por un gen de resistencia a antibiótico (*cassette* de resistencia), compuesto por el gen *aph* que confiere resistencia a kanamicina, o el gen *cat* que confiere resistencia a cloranfenicol. La técnica de mutación por intercambio alélico involucra la recombinación homóloga entre los productos de PCR y el genoma de la bacteria. Para esto, se utiliza el sistema de recombinación Red del fago lambda ( $\lambda$ ), técnica descrita por Datsenko y Wanner en el año 2000 (Datsenko and Wanner 2000) que facilita la recombinación.

**3.3.1- Obtención del producto de PCR para mutagénesis.** Se diseñaron partidores de aproximadamente 60 pb, en cuyos extremos 5'- contienen 40 pb con homología a las regiones 5'- y 3'- del gen a mutagenizar, mientras que en el extremo 3'- los partidores contienen 20 nucleótidos que hibridan con secuencias presentes en el plásmido pKD3 y pKD4 (en letras rojas, ver Tabla N°3). Estos plásmidos poseen clonado un *cassette* de resistencia, flanqueado por secuencias FRT. El plásmido pKD3 posee el gen *cat*, mientras que el plásmido pKD4 posee el gen *aph*. Para amplificar el *cassette* de resistencia se utilizó el plásmido pKD3 ó pKD4 como templado.

### **3.3.2- Preparación de células electrocompetentes**

**3.3.2.1- Para electrotransformación con plásmido.** Las bacterias se cultivaron a una temperatura de 37 °C en 2 ml de caldo LB con agitación constante O.N. Se centrifugó el cultivo a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 1 mL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante para luego resuspender el pellet en 1 ml de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Se repitió nuevamente el paso anterior para alcanzar así 3 lavados sucesivos. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril.

**3.3.2.2- Para el paso de mutagénesis.** Se cultivaron bacterias previamente electrotransformadas con el plásmido pKD46 en 2 mL de caldo LB más 2 µL de ampicilina (100 mg/mL) a 30°C O.N. con agitación constante. A partir de este cultivo se tomaron 300 µL y se crecieron en 30 mL de caldo LB con 400 µL de arabinosa 1M y 30 µL de ampicilina (100mg/mL) a 30°C con agitación constante hasta una OD<sub>600</sub> = 0,4. Se centrifugó el cultivo a 4.500 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 30 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se centrifugó nuevamente a 4.500 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante para luego resuspender el pellet en 30 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se repitió nuevamente el paso anterior resuspendiendo el pellet final en 1 mL de miliQ estéril. Se centrifugó la muestra a 14.000 rpm por 5 min a 4°C. El paso anterior se repitió una vez más, resuspendiendo finalmente en 80 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril.

**3.3.3- Mutagénesis.** Se prepararon bacterias electrocompetentes de las cepas STH2370/pKD46 y STM 14028s/pKD46. Paralelamente se dializó el producto de PCR obtenido para mutagénesis durante 60 min en agua miliQ. Se mezcló 80  $\mu$ L de células electrocompetentes con 20  $\mu$ L aproximadamente de producto de PCR dializado. Se electrotransformó en un electroporador E. coliPulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 kV. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C por 1 h para su recuperación. Luego, se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min y se resuspendió en 50  $\mu$ L del mismo caldo, para por último ser sembradas en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico de selección correspondiente, ya sea kanamicina (50 mg/mL) ó cloramfenicol (20 mg/mL) e incubadas O.N.

**3.3.4- Confirmación de las mutaciones.** El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante reacciones de PCR descritas en el punto 3.1.8.2 utilizando partidores internos STY1408 qPCR (ver Tabla N°4). Como templado se resuspendieron 2 colonias al azar resultantes del método de mutagénesis (3.2.3) en 50  $\mu$ L de agua L.N e incubadas a 95°C por 10 minutos. La suspensión fue centrifugada a 6.000 rpm por 3 min y se tomaron 5  $\mu$ L de la parte superior del sobrenadante como templado para realizar la mezcla de PCR. La reacción de PCR se realizó como esta descrito en el punto 3.1.8.2. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa para su confirmación. Como control se realizó la reacción de PCR utilizando colonias de *S. Typhi* o *S. Typhimurium* silvestres.

### **3.4. Ensayo de motilidad.**

En placas de 20 mL de agar LB semisólido (3 g/L de agar), se inocularon 2  $\mu$ L de un cultivo crecido hasta una  $O.D_{600} = 0,4$  inyectándolos con ayuda de una micropipeta. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h aproximadamente.

### **3.5. Ensayo de infección *in vitro***

**3.5.1. Cultivo celular.** Las células fueron cultivadas y mantenidas en 5 mL de medio DMEM suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS) a una temperatura de 37°C y en ambiente de humedad con 5% CO<sub>2</sub>.

**3.5.2. Siembra de células HEp-2 para infección *in vitro*.** Se descartó el medio contenido en la botella y se agregó 1 mL de tripsina, para posteriormente incubar por 10 min a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se inactivó la tripsina añadiendo 1 mL de DMEM 10% FBS y se resuspendió con pipeta serológica cuidadosamente y las células resuspendidas fueron traspasadas a un tubo de fondo cónico estéril. Se centrifugó 5 min a 1.500 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 2 mL de RPMI 10% FBS. Se tomó una pequeña alícuota (10 a 20  $\mu$ L), la que se utilizó para contabilizar las células en una cámara de Neubauer. Se determinó la concentración de células por mL de cultivo según el n° de células contabilizadas multiplicadas por la constante de la cámara de Neubauer multiplicado por el factor de dilución utilizado para el conteo. Luego, en placas de ELISA de 96 pocillos se sembraron  $5 \times 10^5$  células y se incubó la placa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> O.N.



**3.5.3. Ensayo de protección a gentamicina en línea celular HEp2.** Se sembraron las cepas bacterianas utilizadas en un ambiente de microaerofilia y se llevaron hasta  $OD_{600nm}=0,2$ . Los cultivos fueron centrifugados y el *pellet* resuspendido en 1 ml de DMEM 10% FBS. Posteriormente, se infectó con una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias por célula eucarionte y se incubó por 1 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se lavó 3 veces las células infectadas con 100 µL de PBS y se agregó 100 µL de desoxicolato 0,5% p/v en PBS. La lisis de las células con desoxicolato en este punto nos permite cuantificar la adherencia de las bacterias. Para determinar el número de bacterias adheridas, se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se sembraron 5 µL de cada dilución en placas de agar suplementadas con el antibiótico de selección correspondiente. Por otro lado, sobre otro set de células infectadas, se agregó 100µL de DMEM 10% FBS suplementado con 200 µg/mL de gentamicina y se incubó por 2 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para el ensayo de invasión. Por último, las células fueron lavadas, lisadas, diluías y sembradas tal como se describió para el ensayo de adherencia. Finalmente, luego de un tiempo de incubación de 16 h (tanto para el ensayo de adherencia como para el ensayo de invasión) se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU) (Contreras *et al.* 1997).

### **3.6. Ensayo de infección en modelo murino.**

Se creció un cultivo bacteriano microaerofílico como describió anteriormente para infectar células hasta un  $OD_{600}=0,2$ . Luego se centrifugó el cultivo a 4.500 rpm por 10 min. El *pellet* se resuspendió en 1 mL de suero fisiológico estéril (9 g/L de NaCl), para posteriormente diluir 200 µL de bacterias resuspendidas en un volumen final de 600 µL. Se infectaron

ratones BALB/c (3 ratones por cada grupo) con 100  $\mu$ L de la dilución final ( $50 \times 10^6$  bacterias totales). En el día 5 postinfección para infección o día 1 postinfección para infección intraperitoneal los ratones fueron sacrificados. Se colectaron hígado y bazo, los cuales fueron homogenizados con un mL de suero fisiológico y posteriormente diluidos de manera seriada en base 10 hasta alcanzar una dilución máxima de  $10^5$ . Se sembraron 5  $\mu$ L de cada dilución sobre placas agar LB para las cepas silvestres y placas suplementadas con cloramfenicol (20 mg/mL) para las cepas mutantes, las cuales se incubaron durante 16 h aproximadamente a 37°C para finalmente realizar el conteo de CFU. Se controló el peso de cada ratón diariamente masándolos en una balanza granataria. El protocolo utilizado fue aprobado por el comité de bioética de la universidad Andrés Bello en el acta de aprobación 016/2015.

### **3.7. Análisis estadísticos.**

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre medidas dos grupos, se utilizó la prueba de *t student* o *t test*, de un factor con dos colas, con un intervalo de confianza de 5 ( $\alpha = 0,05$ ). Esta prueba fue calculada por el software GraphPad Prism 5.00.288.

## 4. RESULTADOS

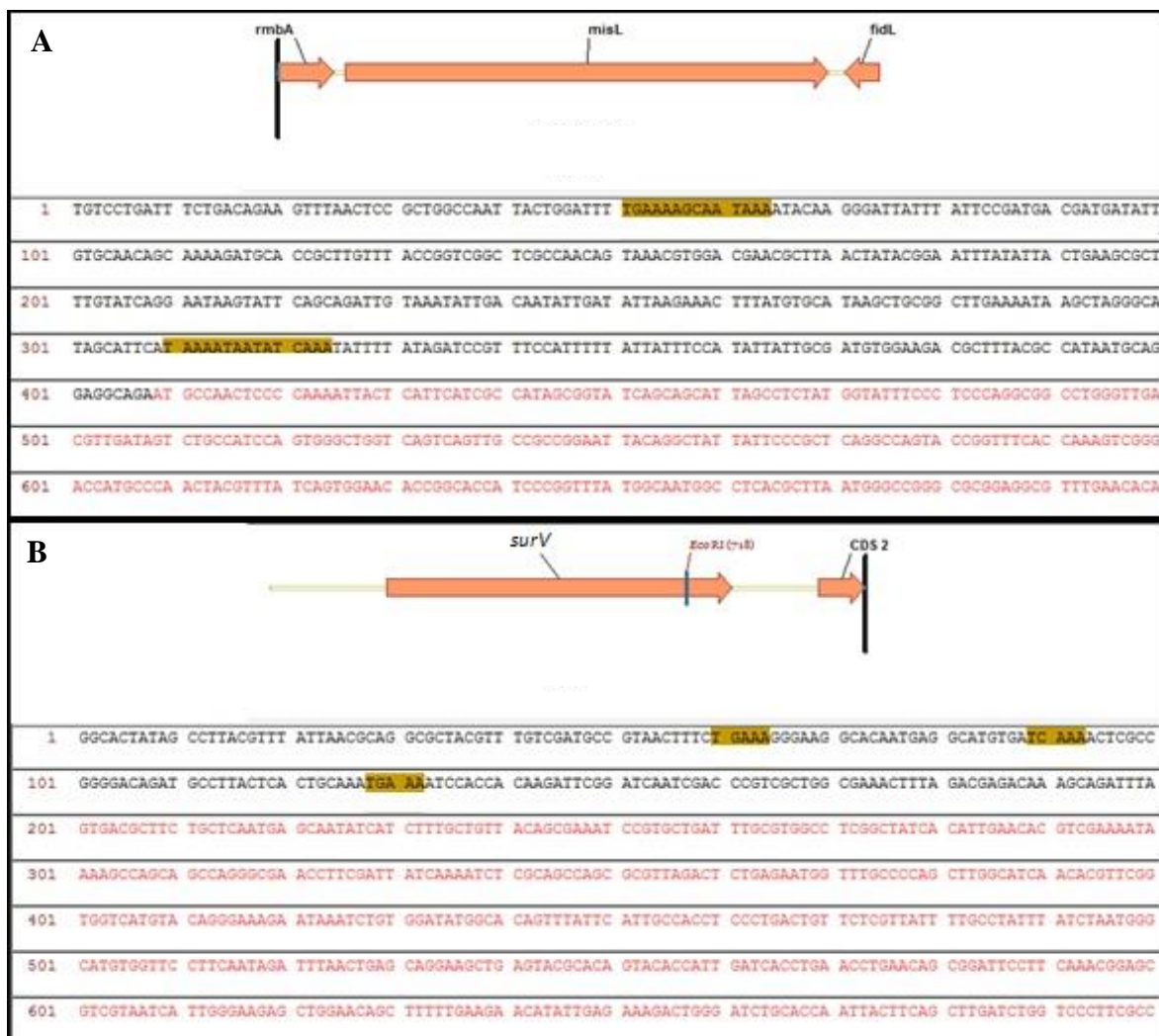
### 4.1. Identificación de posibles genes blanco de *marT* en *Salmonella Typhi*.

Al realizar el alineamiento *in silico* de la secuencia consenso TNAAANNNNNTNAAA con el genoma de referencia de STY CT18 se obtuvieron 106 posibles genes candidatos, que contenían dicha secuencia en su caja promotora. Estos 106 genes fueron clasificados según su ubicación (hebra directa o complementaria) y distancia con respecto al nucleótido +1 de la transcripción de la secuencia consenso. Así, se obtuvo que en 50 de estos 106 genes candidatos la secuencia consenso se encuentra ubicada en la hebra directa, mientras que en 56 de ellos se encuentra en la hebra complementaria. Mientras que, bajo un segundo criterio de clasificación (independiente de la ubicación), se obtuvo que en 68 de los 106 genes candidatos la secuencia consenso se encuentra río arriba del nucleótido -51, mientras que en 11 de ellos dicha secuencia se encuentra presente entre los nucleótidos -50 al -36. Para 20 de los 106 candidatos a blanco la secuencia consenso está presente entre los nucleótidos -35 al -11 y, finalmente, 7 de los 106 genes candidatos poseen presente la secuencia consenso entre los nucleótidos -1 al -10 (Tabla 5). Cabe destacar que – como se señaló anteriormente – estos criterios de clasificación son totalmente independientes uno del otro.

Clasificación		Número de genes
Hebra	Posición	
Directa		50
Complementaria		56
	> -51	68
	-50 al -36	11
	-35 al -11	20
	-10 al -1	7

**Tabla 5.- Clasificación de genes candidatos blanco según ubicación y distancia de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes.**

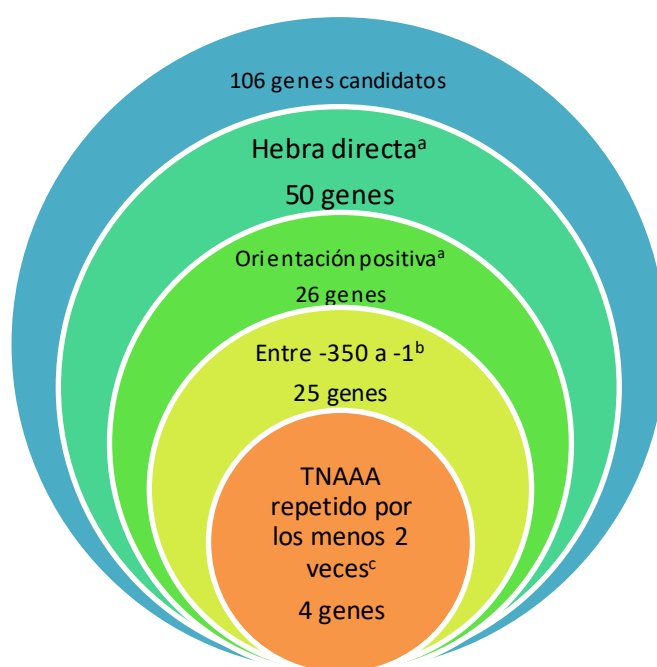
A partir de esta clasificación se procedió a filtrar estos genes, según el número, orientación y distancia de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes candidatos. Para esto se tomó como referencia aquellos genes que han sido reportados como blanco de *marT*, es decir, *misL* (regulación positiva en STM) y *surV* (regulación negativa en una expresión heteróloga de *marT* en STY), ya que estas serían las condiciones necesarias para que MarT recozca la secuencia dentro de las cajas promotoras de los genes a los cuales regula. El análisis de los parámetros mencionados en los genes de referencia arrojó como resultado que la secuencia se encuentra presente en duplicado en el gen *misL*, con una orientación positiva según el sentido de la transcripción, una de las repeticiones se ubica dentro de los 100 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mientras que la segunda repetición se encuentra alrededor del nucleótido -350. Mientras que para el gen *surV* dicha secuencia no se encuentra de manera completa, sino que sólo un directo repetido de esta (TNAAA) y en triplicado, mientras que la orientación de las 3 repeticiones es positiva y, su distancia se encuentra dentro de los 100 nucleótidos río arriba del +1, manteniéndose así, las mismas características en cuanto a orientación entre los 2 genes (Figura 3).



**Figura 3.- Análisis de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes blanco reportados. A *misL*. B *surV*.** Las flechas naranjas representan los marcos de lecturas y parte del contexto genético para cada gen. Letras rojas muestran parte del marco de lectura. Recuadros amarillos destacan las secuencias consensos presentes en la caja promotora de cada gen.

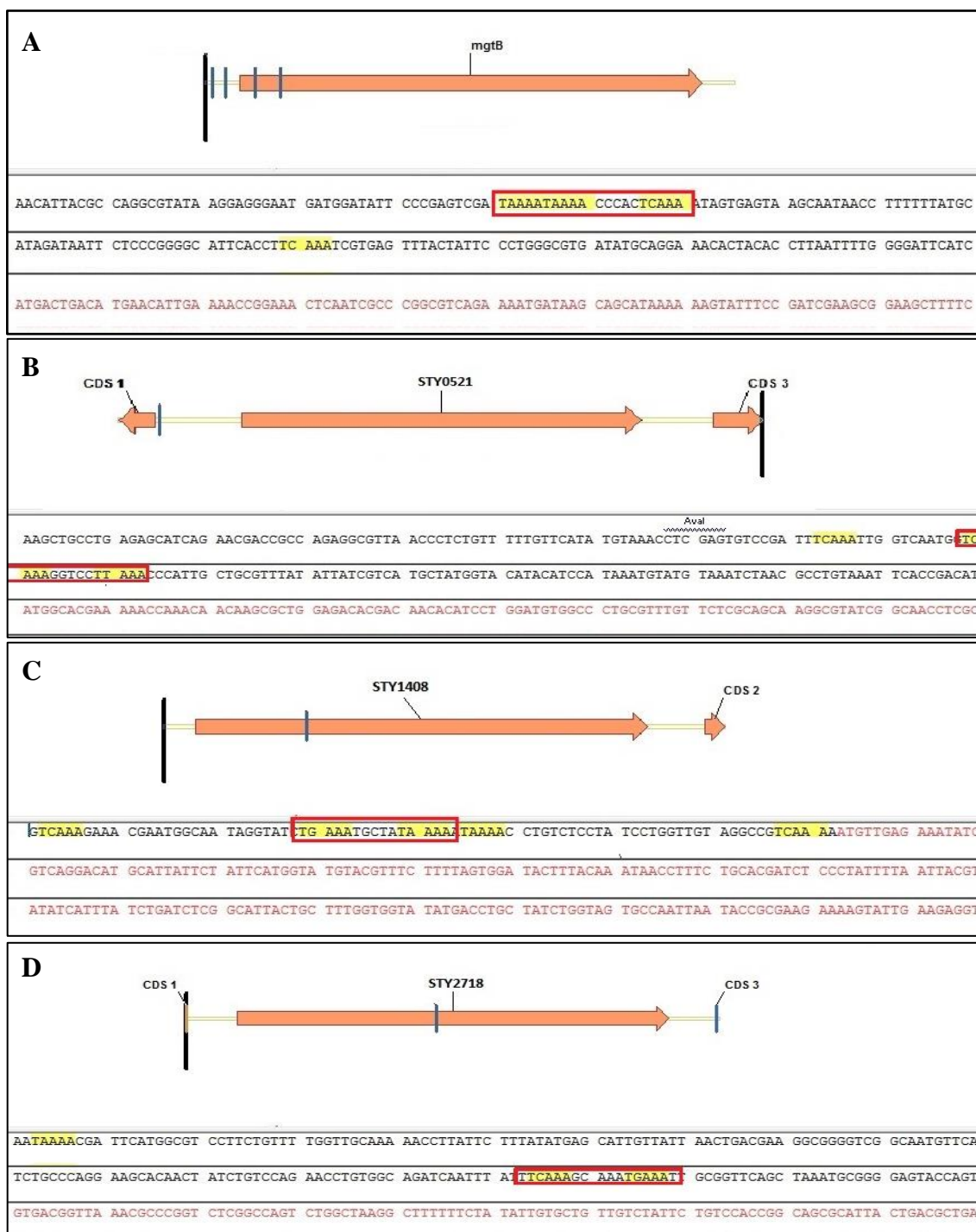
Con estos datos, se filtraron los 106 genes candidatos buscando que un directo repetido de la secuencia se encontrara presente al menos 2 veces en la caja promotora de cada gen (ya que de esta manera también es posible encontrar la secuencia consenso completa) con una orientación positiva y en una distancia menor a 400 nucleótidos río arriba del +1 (Figura 4).

Los resultados arrojaron como candidatos finales a los genes *mgtB*, STY0521, STY2718 y STY1408 (Figura 5).



**Figura 4.- Filtro de genes candidatos blanco según orientación<sup>a</sup>, distancia<sup>b</sup> y número<sup>c</sup> de la secuencia consenso presente en la caja promotora**

Interesantemente, el transportador de magnesio *mgtB* se encuentra localizado en SPI-3, al igual que *marT* (Snavely, *et al.* 1991). Por otro lado, STY0521 se encuentra anotado como un represor del operón *acrAB*, mientras que STY2718 como un sensor de nitrato y, por último, STY1408 está anotado como un quimiorreceptor (Tabla 6).



**Figura 5.- Análisis de la secuencia consenso presente en la caja promotora de los genes blanco candidatos finales. A** *mgtB*. **B** STY0521. **C** STY1408. **D** STY2718. Las flechas naranjas representan los ORFs y parte del contexto genético para cada gen. Letras rojas muestran parte del ORF. Recuadros amarillos destacan un directo repetido de las secuencias consenso presentes en la caja promotora de cada gen. Cuadros rojos enmarcan la presencia de la secuencia consenso completa.

Gen	Gen ID	Secuencia	Posición	Función
STY1408	1247802	TCAAA	-81	Quimiorreceptor
		TGAAATGCTATAAAA	-54	
		TAAAA	-38	
		TCAAA	-6	
STY0521	1246994	TCAAA	-118	Represor de <i>acrAB</i>
		TCAAAGGTCCTTAAA	-103	
STY2718	1249033	TAAAA	-198	Sensor de nitrato
		TCAAAGCAAATGAAA	-47	
<i>mgtB</i>	1250262	TAAAA	-150	Transportador de magnesio
		TAAAACCCACTCAAA	-145	
		TCAAA	-72	

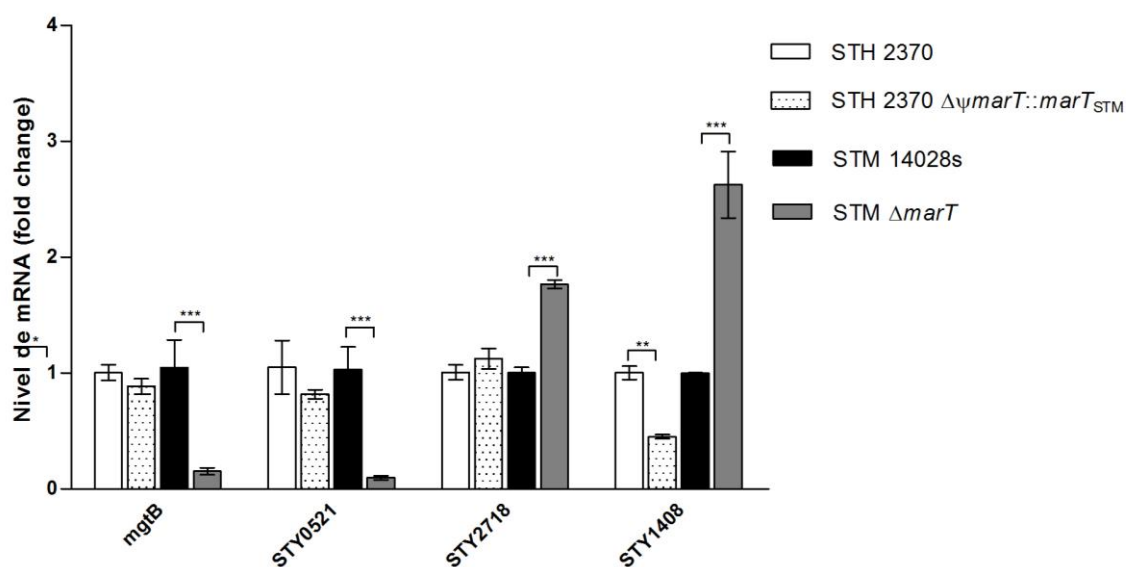
**Tabla 6.- Genes candidatos blanco finales.** Se muestra la secuencia presente en la caja promotora de los genes candidatos blanco (ya sea sólo 1 directo repetido o la secuencia completa) y su posición dentro del promotor. Se destacan los nucleótidos conservados para las secuencias presentes en cada uno de los genes.

#### 4.2. Validación de posibles genes blanco de *marT*.

Una vez identificados los potenciales genes blancos, se procedió a validar los cambios de expresión de estos genes en presencia y ausencia del gen *marT* en STM y en una expresión heteróloga de *marT*<sub>STM</sub> en STY. Para esto, se extrajo RNA total (métodos 3.1.4) a partir de cultivos crecidos O.N. de las cepas STM y STY silvestres, además de las cepas mutante STM  $\Delta marT::aph$  y la cepa STH2370  $\Delta\Psi marT::marT_{STM}$ . Después de tratar con DNasa (métodos 3.1.5), cuantificar y verificar la integridad del mRNA (métodos 3.1.6 y 3.1.7) se realizó una transcripción reversa (métodos 3.1.8) para la obtención de cDNA total. Los niveles de mRNA de los 4 genes candidatos blanco fueron medidos mediante RT-qPCR con partidores internos específicos para cada gen (Tabla 3), lo cual arrojó como resultado congruente y estadísticamente significativo una regulación negativa sobre la expresión del gen STY1408 por parte de *marT* (Figura 6). Si bien, los niveles de mRNA para todos los genes medidos mostraron diferencias significativas entre la cepa mutante *marT* y la cepa silvestre en el



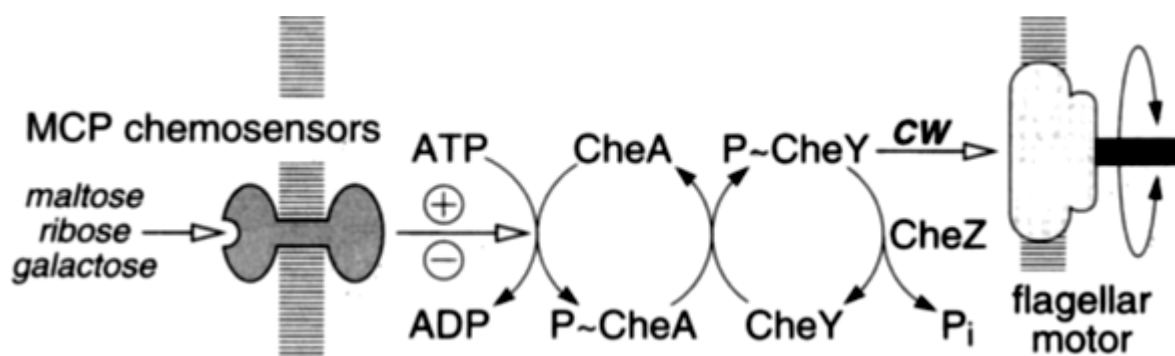
serovar Typhimurium, el efecto contrario esperado en STY dada la restitución del gen funcional *marT* sólo fue vista para el gen STY1408. Por ejemplo, los niveles de mRNA para los genes *mgtB* y STY0521 disminuyeron significativamente en STM  $\Delta marT::aph$  comparados con la cepa silvestre, lo cual indicaría que *marT* estaría involucrado en una regulación transcripcional positiva sobre estos genes, sin embargo, al comparar los niveles de expresión de estos genes en la cepa STY que expresa de manera heteróloga el gen *marT*<sub>STM</sub> con la cepa STY silvestre, se aprecia una leve baja no significativa en la expresión de estos genes, siendo no consistentes los resultados entre STM y STY, ya que al disminuir el nivel de expresión en ausencia de *marT*, el resultado esperado sería que en presencia de este, los niveles de mRNA para los genes medidos aumentarían, no obstante, estos disminuyen levemente sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 6). Con estos resultados se procedió entonces a revisar la bibliografía disponible para STY1408.



**Figura 6.- Nivel de expresión de genes candidatos blanco de *marT*.** Se muestra un ensayo representativo de 2 réplicas biológicas realizadas. \*\* *pValue* <0,005. \*\*\**pValue* <0,0005.

### 4.3. Caracterización fenotípica de STY1408 *in vitro*.

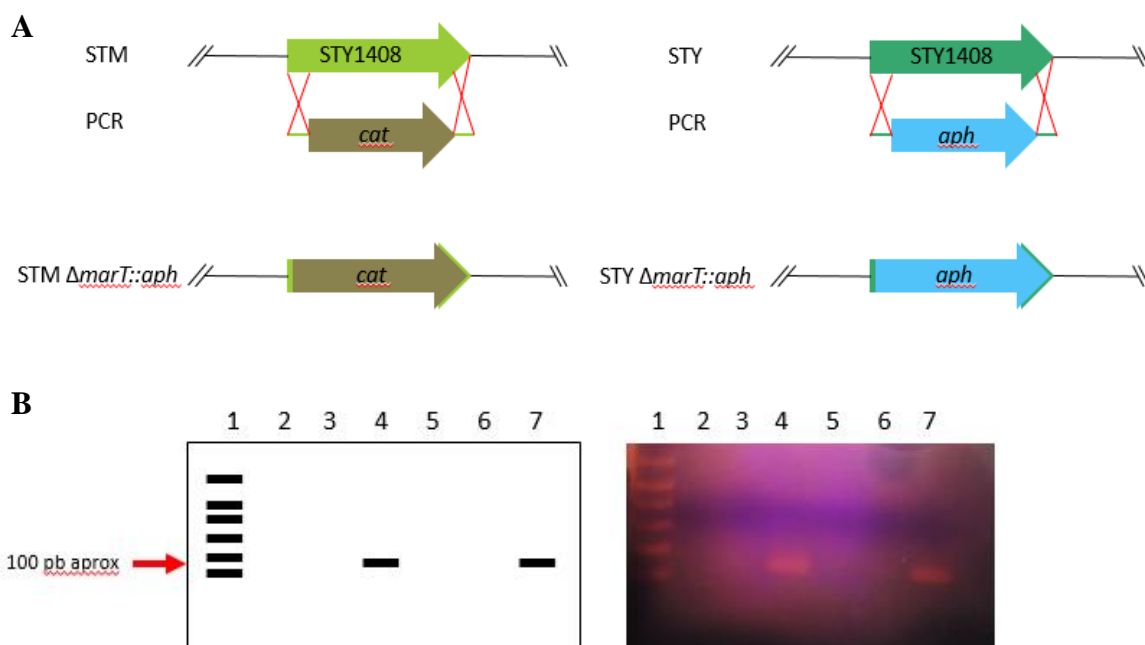
Como se mencionó anteriormente, STY1408 se encuentra anotado, por identidad de secuencias, como un quimiorreceptor (Tabla 6) ya que presenta un 98% identidad con genes de la familia de proteínas quimiotácticas aceptoras de metil (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins* MCPs), las cuales consisten en receptores transmembrana de bacterias motiles Gram negativo como *Escherichia coli* (Parkinson, J.S. 1993). Las proteínas de la familia MCPs, son capaces de detectar la presencia de carbohidratos tales como ribosa, maltosa y galactosa, para posteriormente producir una cascada de fosforilaciones al interior del citoplasma en donde están involucradas las proteínas CheA, CheY y CheZ para finalmente producir la fuerza motora que culmina con la rotación del flagelo de la bacteria y, por lo tanto, se encuentran involucradas en motilidad, tal como lo muestra la Figura 7 (Lux, *et al.* 1995).



**Figura 7.- Esquema de la cascada de fosforilaciones controlada por quimiorreceptores de la familia MCP.** Los quimiorreceptores MCPs controlan el flujo de grupos fosfato a través de una vía de señalización que implica la unión de azúcares, modulando la tasa de autofosforilación de CheA y desencadenando la subsecuente fosforilación de otras proteínas citoplasmáticas que finalmente promueven la rotación del flagelo, (Modificado de Lux, *et al.* 1995).

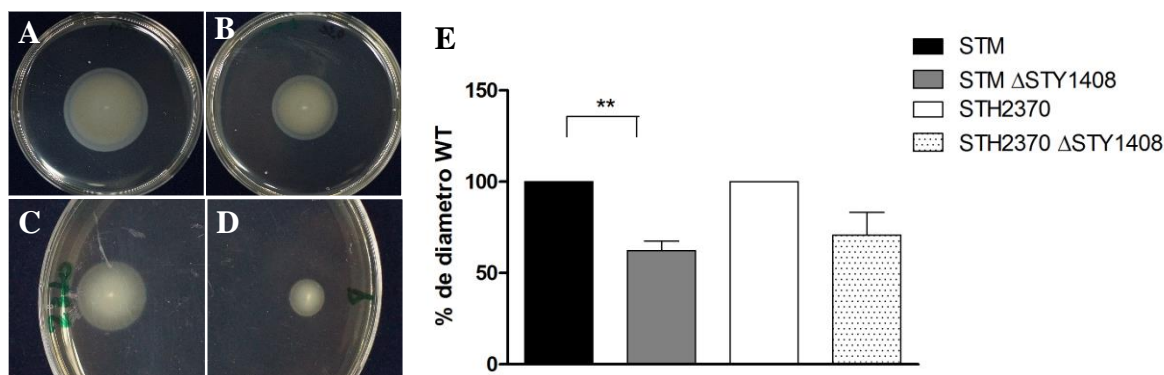
Con estos antecedentes y debido a la participación de las proteínas MCPs en la motilidad de las bacterias, se procedió a evaluar *in vitro* la participación de STY1408 en la motilidad tanto de STM como de STY. Para esto se construyeron las cepas STM y STH con deleciones en el gen STY1408. Se utilizó la técnica de intercambio alélico descrito por Datsenko y Wanner (métodos 3.2) utilizando partidores con homología en el gen STY1408 (Tabla 3), para así poder realizar el intercambio alélico entre los ORFs de STY1408 en STM y STY con el *cassette* de resistencia *cat* y *aph* respectivamente, obteniendo finalmente las cepas STM  $\Delta$ STY1408::*cat* y STY  $\Delta$ STY1408::*aph*. La Figura 8A esquematiza la construcción de estas cepas mutantes.

Una vez obtenidas las cepas mutantes, se procedió a realizar una comprobación genotípica de estas, mediante PCR de colonias (métodos 3.2.4) utilizando partidores internos para el gen STY1408. Los resultados confirman el éxito en la construcción de las cepas mutantes tanto en STM como en STY, dado que no existe presencia de amplicón cuando las cepas STM  $\Delta$ STY1408 y STH2370  $\Delta$ STY1408 son utilizadas como templado para la reacción de PCR. Los amplicones obtenidos en la reacción de PCR corresponden a los 100 pb esperados cuando las cepas STM y STY silvestres son utilizadas como DNA molde (Figura 8B).



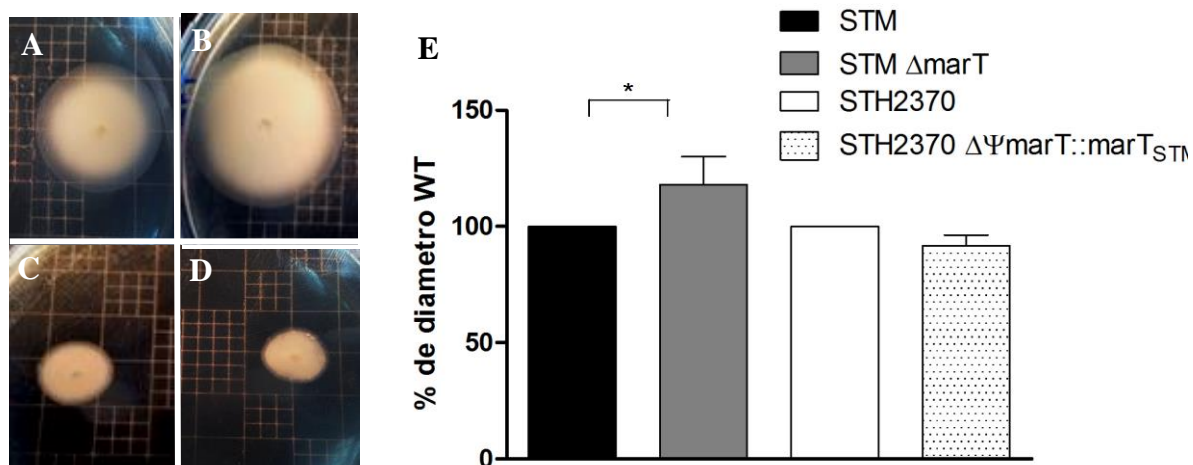
**Figura 8.- Obtención de cepas mutantes STY1408 en STM y STY.** **A,** Esquema de metodología para la obtención de cepas mutantes. **B,** Confirmación genotípica de obtención de cepas mutantes. Carriles **1,** Estándar de peso molecular (1kb plus). **2,** Control negativo (reacción sin templado). **3,** STM  $\Delta$ STY1408::*cat*. **4** STM silvestre. **5 y 6,** STH2370  $\Delta$ STY1408::*aph*. **7** STY silvestre.

Con las cepas mutantes obtenidas y según la bibliografía consultada, se realizaron entonces ensayos *in vitro* de motilidad comparando las cepas silvestres y mutantes para ambos serovares en estudio. De esta manera, los ensayos de motilidad en agar blando o semisólido (métodos 3.3) arrojaron como resultado un porcentaje de motilidad relativo de un 62% y 83% para las cepas mutantes STM y STY respectivamente, evidenciado en un menor diámetro de crecimiento en las cepas STM  $\Delta$ STY1408::*cat* y STH2370  $\Delta$ STY1408::*aph* en comparación a las cepas STM y STH2370 silvestres respectivamente (Figura 9) confirmando que STY1408 participa en la motilidad tanto STM como en STY.



**Figura 9.- Participación de STY1408 en motilidad.** A a D motilidad de las cepas en placas de agar semisólido. Se muestra 1 ensayo representativo de 3 réplicas biológicas independientes. A STM. B STM  $\Delta$ STY1408::cat. C STH2370. D STH2370  $\Delta$ STY1408::aph E Porcentaje de diámetro de crecimiento con respecto a las cepas silvestres. \*\*  $p$ Value  $\leq 0,01$

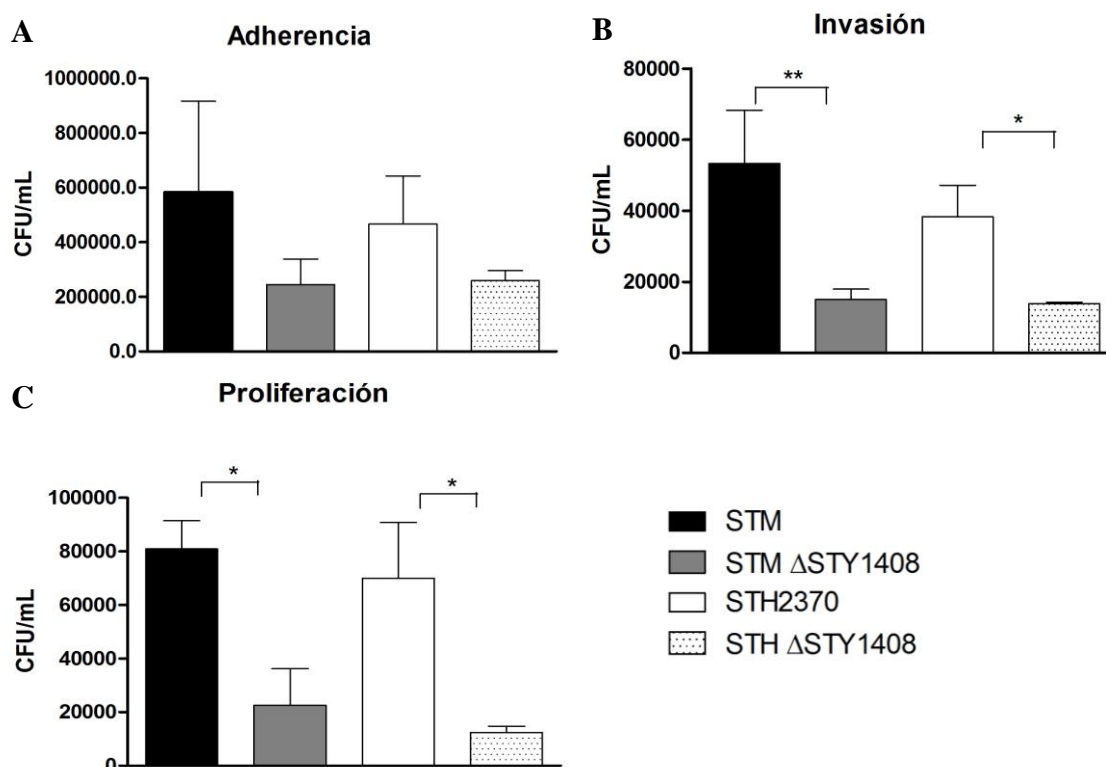
Con la confirmación de la participación de STY1408 en el proceso de motilidad de la bacteria, se realizó un ensayo *in vitro* para determinar la participación de *marT* en la motilidad de ambos serovares, dado que indirectamente estaría involucrado en dicho proceso al estar regulando a nivel transcripcional un gen implicado en la motilidad tanto en STM como en STY. Los resultados muestran que la cepa STM mutante *marT*, posee mayor motilidad que la cepa silvestre, lo que se ve reflejado en un diámetro de crecimiento de aproximadamente un 25% más en comparación a la cepa silvestre, mientras que la cepa STY que expresa heterológicamente el gen *marT*<sub>STM</sub> presenta una motilidad prácticamente igual a la de la cepa STY silvestre, con un diámetro relativo de un 95% (Figura 10). Esto confirma que *marT* está involucrado en el proceso de motilidad de STM y STY.



**Figura 10.- Participación de *marT* en la motilidad de STM y STY.** A a D motilidad de las cepas en placas de agar semisólido. Se muestra 1 ensayo representativo de 3 réplicas biológicas independientes. A STM. B STM  $\Delta marT::aph$ . C STH2370. D STH2370  $\Delta \Psi marT::marT_{STM}$  E Porcentaje de diámetro de crecimiento con respecto a las cepas silvestres. \*  $pValue < 0,05$

Con la confirmación tanto de STY1408 como de *marT* en motilidad, se procedió entonces a realizar ensayos *in vitro* para evaluar la participación de este gen en adherencia, invasión y proliferación ya que es sabido que la función de motilidad - y por tanto también genes involucrados en esta función - es requerida para un adecuado proceso infectivo en de *Salmonella*, ya que juega un rol determinante en el proceso de colonización en infecciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Olsen, *et al.* 2013; Ryan, *et al.* 2016; Rivera-Chávez, *et al.* 2013). Por lo tanto, se infectaron células epiteliales HEp-2 (métodos 3.4) con las cepas mutantes nulas en STY1408 tanto en STM como en STH2370, así como también con las cepas silvestres de cada serovar. Luego de 1 h post-infección los ensayos de adherencia realizados no mostraron diferencias tanto para STM como para STY, mientras que los ensayos de invasión (3 h post-infección) muestran que existe un defecto en la invasión a esta línea celular epitelial tanto en STM como en STH2370 tal como se predecía (Figura 11), obteniendo un porcentaje de invasión relativa menor al 30% para STM y menor de un 50% para STY,

mientras que para el caso de los ensayos de proliferación (24 h post-infección), se aprecia un defecto evidenciado en un porcentaje de proliferación relativa de un 40% aproximadamente para STM y, un 20% aproximadamente para STY. Esto muestra que, tal como se esperaba, mutantes STM y STY en STY1408 son defectuosas en infecciones *in vitro*.

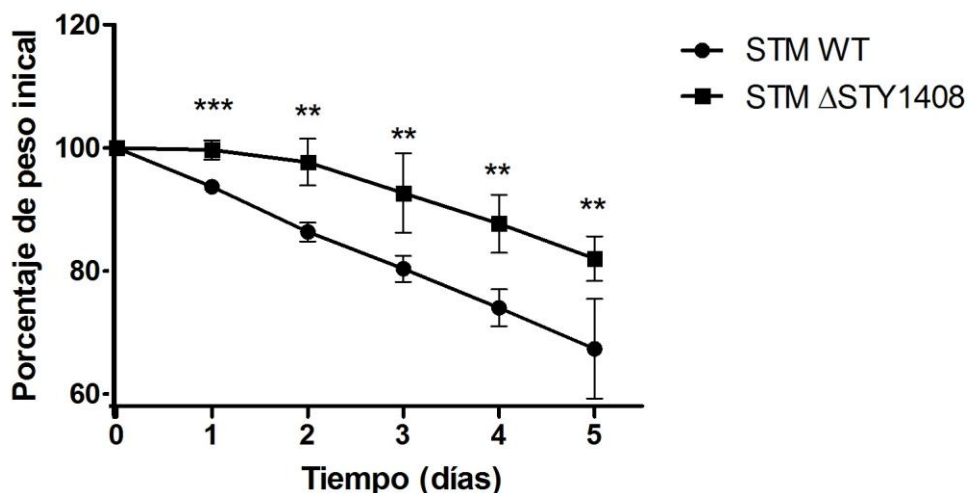


**Figura 11.- Participación de STY1408 en infección *in vitro* en células epiteliales HEp-2.** **A** Adherencia. **B** Invasión. **C** Proliferación. Se muestra el promedio de un triplicado técnico en un ensayo representativo de 3 repeticiones biológicas independientes. \* *pValue* <0,05; \*\* *pValue* <0,01

#### **4.4. Determinación de la participación de STY1408 en virulencia *in vivo*.**

Dados los resultados obtenidos *in vitro*, el siguiente experimento consistió en evaluar la participación de este gen en la virulencia *in vivo* de la bacteria, infectando ratones BALB/c vía oral con las cepas STM silvestre y STM  $\Delta$ STY1408::*cat* (métodos 3.4). Los animales fueron sacrificados al quinto día postinfección, y su peso fue controlado diariamente. En el día 1 postinfección ya fue posible notar diferencias de peso, ya que el peso de los ratones infectados con la cepa silvestre disminuyó a un 94% del peso inicial en promedio, mientras que el peso de ratones infectados con la cepa mutante prácticamente se mantuvo en un 100% respecto del peso inicial. Hacia el final del proceso infectivo los ratones infectados con STM silvestre disminuyeron su peso en aproximadamente un 35%, alcanzando un porcentaje de peso final de alrededor del 65% con respecto a su peso inicial, mientras que el porcentaje de peso final de los ratones infectados con la cepa mutante fue superior al 80% del peso inicial, sugiriendo fuertemente que STM  $\Delta$ STY1408::*cat* habría sufrido defectos en su capacidad infectiva (Figura 12). Esto último fue confirmado luego de la recolección, homogenización, dilución y plaqueo de órganos profundos.

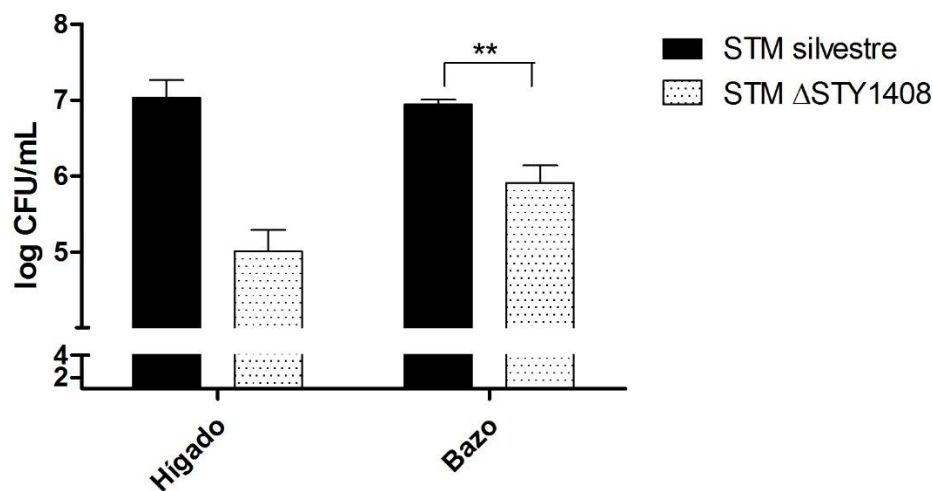




**Figura 12.- Evolución de peso de ratones postinfección oral.** Porcentajes promedio de un triplicado técnico en un ensayo representativo de 3 réplicas biológicas independientes. \*\*  $pValue < 0,01$ . \*\*\*  $pValue < 0,005$

El conteo de CFU en placas, de los homogeneizados de órganos, evidenció diferencias logarítmicas entre ambas cepas para ambos casos, la colonización del hígado y el bazo. Es así como en el conteo de bacterias presentes en hígado es posible notar diferencias de 2 órdenes de magnitud de la cepa silvestre por sobre la cepa mutante, es decir, se recolectaron por lo menos 100 veces más bacterias silvestres que bacterias mutantes, mientras que para el bazo la diferencia es de 1 unidad logarítmica recolectada de STM silvestre por sobre STM  $\Delta$ STY1408::cat (Figura 13).

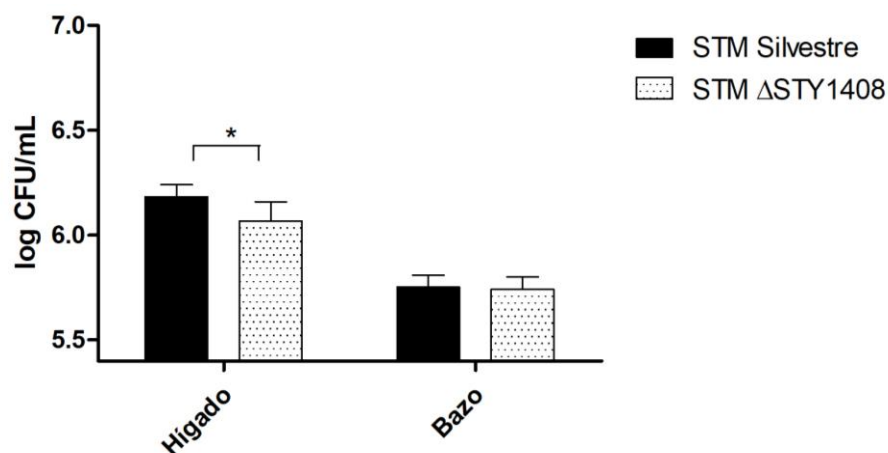
A pesar de contar con diferencias evidentemente notorias a nivel biológico, para el conteo de CFU apartir de hígado no se reportaron diferencias estadísticamente significativas en infecciones orales, esto debido a las grandes desviaciones estándar obtenidas, las cuales son propias de la utilización de modelos vivos en este tipo de ensayos



**Figura 13.- Participación de STY1408 en infección oral *in vivo* en ratones.** Se muestra el promedio de un triplicado técnico en un ensayo representativo de 3 repeticiones biológicas independientes. \*\* *pValue* <0,01

Con el fin de determinar la participación de STY1408 en la invasión *in vivo* es que se realizaron ensayos de infección intraperitoneal en modelo murino. De esta manera los resultados podrían indicar en qué etapa del ciclo infeccioso de *Salmonella* está involucrado dicho gen. Los resultados obtenidos muestran que, si bien existe un defecto en la colonización de órganos profundos por parte de las bacterias mutantes, las diferencias obtenidas con respecto a la cepa STM silvestre son mucho menores que las obtenidas para las infecciones realizadas vía oral, ya que no existen diferencias logarítmicas entre sí, es decir, el número de bacterias colectadas a partir de ratones infectados con cepas silvestres o mutantes se encuentra en el mismo orden de magnitud, tanto en hígado como en bazo (Figura 14).

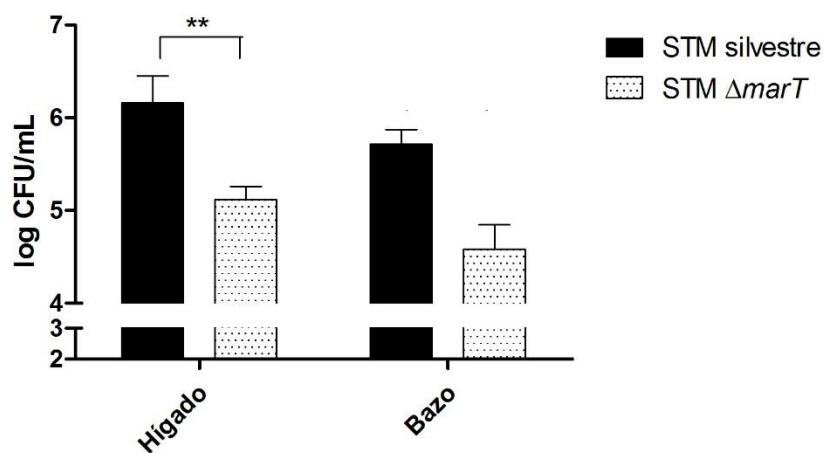
Finalmente, y habiendo confirmado la participación de STY1408 en la invasión de una infección *in vivo*, se realizó un ensayo de infección oral con el fin de determinar la participación del regulador transcripcional MarT en la virulencia de STM.



**Figura 14.- Infección intraperitoneal de ratones.** Se muestra el promedio de un triplicado técnico en un ensayo representativo de 2 repeticiones biológicas independientes.\* *pValue* <0,05

Dado que, MarT participa en la regulación negativa ejercida sobre STY1408, cuyas mutantes son defectuosas en infecciones *in vivo* en ratón, se esperaría que una mutante *marT* fuese más virulenta que una cepa STM silvestre, dado que al estar ausente *marT* no puede estar reprimiendo la expresión de STY1408. Sin embargo, se obtuvo una menor cantidad de CFU desde órganos recolectados a partir de ratones infectados con la cepa mutante *marT* en comparación a la cepa silvestre, obteniendo diferencias en escala logarítmica (Figura 15), mostrando que una cepa STM mutante *marT* posee un defecto en la colonización de órganos profundos.

Nuevamente, las claras diferencias biológicas obtenidas en este ensayo no representan diferencias estadísticamente significativas dadas las magnitudes de las desviaciones estándar obtenidas.



**Figura 15.- Participación de marT en infección oral *in vivo* en ratones.** Se muestra el promedio de un triplicado técnico en un ensayo representativo de 3 repeticiones biológicas independientes. \*\* *pValue* < 0,01

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Genes blanco de MarT

Ensayos *in silico* mostraron que en los 4 genes candidatos finales se encuentra presente una copia de la secuencia consenso completa que es reconocida por MarT, incluyendo ambos directos repetidos y espaciador (Figura 5). La extensión de 15 nucleótidos totales de esta secuencia sugiere que MarT podría actuar como dímero para ejercer su función, ya que según la estructura del DNA propuesta por Watson y Crick, un giro completo para una hebra de DNA abarca 10 nucleótidos y una distancia de 34 Å (Watson and Crick. 1953), considerando esto, ambos directos repetidos de la secuencia consenso se encontrarían mirando hacia el mismo espacio físico, es decir, un directo repetido (TNAAA) se encuentra a un giro de DNA del otro en la secuencia consenso conocida, permitiendo el acoplamiento de un monómero de MarT a cada directo repetido de la secuencia consenso reconocida.

La idea de la dimerización de MarT, encuentra sustento cuando miramos proteínas de la familia a la cual pertenece (Tükel, *et al.* 2007). ToxR, por ejemplo, es un factor transcripcional capaz de formar homodímeros cuando existe una sobreexpresión de este, mientras que cuando su nivel de expresión es normal, es capaz de formar heterodímeros junto con ToxS en *Vibrio cholerae* en el periplasma (Ottemann and Mekalanos. 1996), y se ha visto que mutantes ToxR incapaces de formar heterodímeros con ToxS se ven afectadas en su actividad (DiRita and Mekalanos 1991) y que la expresión del regulón de ToxR disminuye su expresión (Ottemann and Mekalanos. 1996), sugiriendo que la dimerización ToxR-ToxS es fundamental para su normal funcionamiento. MarT por su parte, pertenece a esta familia de reguladores ya que (i) posee el sitio de unión a DNA *winged helix-turn-helix*, (ii) posee

dominios de unión transmembrana y, además, (iii) tiene un 32% de similitud aminoacídica con ToxR (Blanc-Potard, *et al.* 1999), lo que sugiere que MarT podría actuar como dímero al igual que los reguladores de la familia a la cual pertenece.

Por otro lado, los análisis *in silico* realizados con la proteína surV, sugieren que MarT podría reconocer sólo un directo repetido, o bien, ser capaz de reconocer más de una secuencia distinta, tal como lo hace ToxR en la regulación que ejerce sobre la toxina del colera, en donde se une a la región del gen que la codifica, reconociendo la secuencia heptamérica TTTTGAT (Miller, *et al.* 1987). Otras proteínas pertenecientes a esta familia, también son capaces de reconocer secuencias distintas a la secuencia consenso reportada para marT (Tükel, *et al.* 2007) en las cajas promotoras de los genes a los cuales regulan. Ejemplos de esto son TcpP, el cual reconoce la secuencia TGTAANNNNNNTGTAA (Goss, *et al.* 2010), y PhoB, que es capaz de reconocer la secuencia TGTCANNNNNNTGTCA (Diniz, *et al.* 2011). Por lo tanto, podríamos especular que MarT podría reconocer una secuencia particular no determinada, y además, también conduce a la especulación de que es posible que existan otros genes regulados por MarT que se encuentren fuera de los 106 posibles genes blanco encontrados en este estudio. por lo que sería necesario otros ensayos para poder determinar esto.

En cuanto a los 3 genes candidatos finales restantes (*mgtB*, STY0521 y STY2718) los resultados muestran una clara diferencia en los niveles de expresión para todos los genes en el serovar Typhimurium. Tanto para *mgtB* y STY0521, los resultados muestran que MarT estaría participando en la activación de la expresión de estos genes, ya que en ausencia de este regulador la expresión de los genes blancos disminuye notablemente en la cepa STM  $\Delta$ marT::aph, llegando a ser 10 veces menor con respecto a la cepa silvestre, indicando

fuertemente que MarT participaría en la regulación transcripcional positiva de la expresión de dichos genes (Figura 6). Sin embargo, en el serovar Typhi la restitución de *marT*<sub>STM</sub> no produjo un aumento en los niveles de mRNA de estos genes. Los resultados indican el mismo efecto para STY2718 pero en el sentido opuesto de regulación. Por lo tanto, esto sugiere que MarT participa en la regulación de estos genes en STM. Si esta regulación es directa o indirecta, aún debe ser demostrado.

## 5.2. Caracterización de STY1408.

Como se mencionó en la sección de resultados, STY1408 posee un 98% de identidad con proteínas MCPs. Su participación en la motilidad de *Salmonella* fue confirmada por los resultados obtenidos, tanto en STM como en STY (Figura 9). Es probable que esta deficiencia en la motilidad de las cepas mutantes esté dada por la capacidad de detectar la presencia de azúcares y dirigir el nado de la bacteria hacia ellos, lo cual es característico de la función quimiotáctica de las proteínas MCPs (Lux, *et al.* 1995) en la cual estaría involucrado STY1408. Si bien ha sido reportado que las proteínas MCPs son capaces de sensar la presencia de azúcares como maltosa, ribosa y galactosa (Parkinson, J.S. 1976), son necesarios ensayos adicionales para poder determinar si este gen efectivamente es capaz de sensar dichos carbohidratos (u otros) y, si su función es o no la de un quimiorreceptor, tal como lo sugiere el gran porcentaje de identidad que posee con la familia MCPs.

Estudios muestran que genes relacionados con este tipo de funciones (motilidad o quimiotaxis) son esenciales para un ciclo infeccioso exitoso de STM *in vivo*, ya que su participación en el proceso de colonización en infecciones tanto *in vitro* como *in vivo* es determinante, ya que mutantes en genes relacionados con motilidad o quimiotaxis se vuelven

menos virulentas en relación a las cepas silvestres (Olsen, *et al.* 2013; Ryan, *et al.* 2016; Rivera-Chávez, *et al.* 2013). De hecho, análisis de secuenciación masiva de RNA muestran diferencias entre los transcriptomas de cepas poco patogénicas (LP por low-pathogenicity) de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis versus cepas altamente patogénicas (HP por high-pathogenicity) de la misma bacteria. Tal es el caso de las cepas LP que mostraron una significativa reducción en la expresión de muchos reguladores transcripcionales y de genes involucrados en virulencia, tales como los genes de fimbrias y genes de motilidad presentes en las islas SPI-1 y SPI-5. Por lo tanto, los resultados obtenidos en las infecciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 11; 12; 13 y 14) concuerdan con los datos de la literatura. Además, al comparar los resultados de infección *in vitro* con los resultados de infección oral en ratones (Figuras 11 y 13), vemos que el defecto de las cepas mutantes en invasión y proliferación en los ensayos *in vitro* se magnifican en una infección *in vivo*, dando aún más relevancia a la participación de STY1408 en virulencia. Por otro lado, los resultados obtenidos en infecciones intraperitoneales (Figura 14) sugieren que el defecto en la invasión de las cepas mutantes STM y STY en el gen STY1408 visto en los ensayos *in vitro* (Figura 11 C), podría ser consecuencia de un defecto en invasión más que de proliferación propiamente tal, dado que, en una infección intraperitoneal, el defecto en la virulencia de la cepa mutante es mucho menor que en una infección oral (Figura 13). Por lo tanto, vemos que la participación de STY1408 en virulencia, es a nivel de la invasión del patógeno en el hospedero, ya que en una infección intraperitoneal (Figura 14), las diferencias en cuanto a virulencia disminuyen si son comparadas con una infección vía oral (Figura 13), lo que sugiere que STY1408 no estaría participando en el proceso infeccioso en una infección sistémica, cuando la bacteria ya es diseminada en el organismo del hospedero.

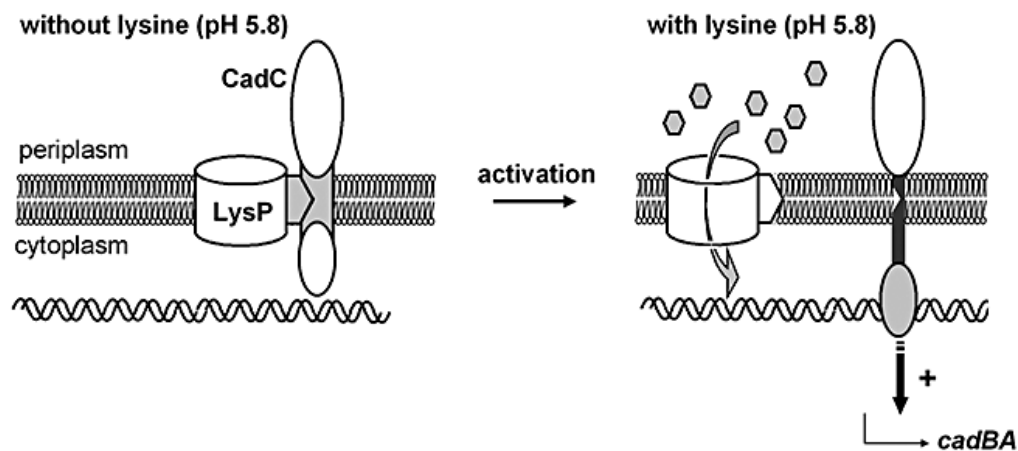


Consecuentemente con lo anterior, se ha reportado que genes de motilidad tales como los componentes estructurales del flagelo, genes de la maquinaria de síntesis de flagelo o bien, genes que exportan componentes del flagelo, no participan en la infección sistémica *in vitro* de STM a macrófagos de ratón (Schmitt, *et al.* 2001) lo cual concuerda con los resultados obtenidos en infecciones intraperitoneales (Figura 14). Al tratarse de un gen involucrado en motilidad (Figura 9), STY1408 participaría en la primera parte del ciclo en donde estos genes son requeridos para la adherencia, invasión y colonización del intestino, y no en la infección sistémica propiamente tal en donde la bacteria es fagocitada y diseminada por células fagocíticas (Hurley, *et al.* 2014)

### **5.3. MarT está involucrado en la motilidad de *Salmonella Typhimurium*.**

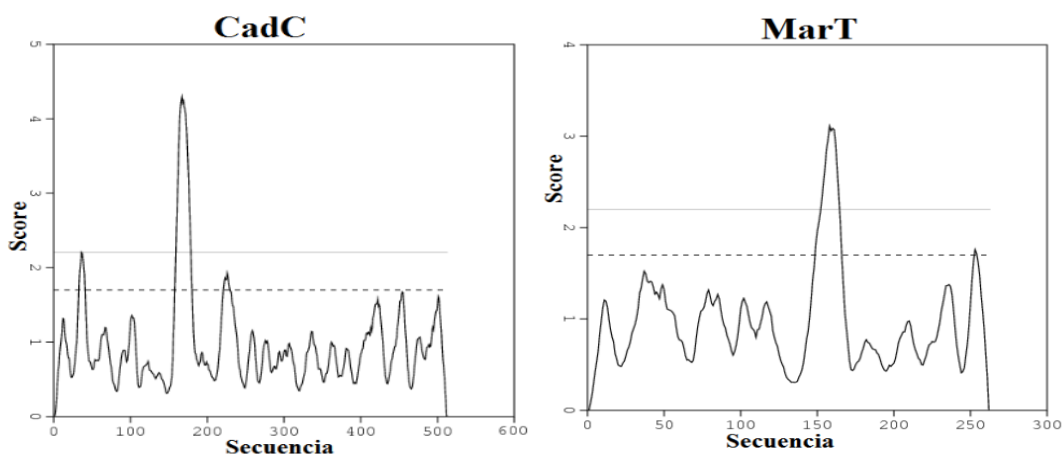
Dado que STY1408 participa en la motilidad tanto de STM como de STY, y que este gen está siendo regulado (ya sea directa o indirectamente) por MarT, es que se realizaron ensayos para evaluar la participación del regulador MarT en la motilidad de STM y STY. Tal como se esperaba, estos muestran que *marT* se encuentra involucrado en dicho proceso, tal es así, que la cepa STM mutante *marT* muestra en promedio un 25% más de motilidad relativa con respecto a la cepa silvestre (Figura 10). Sin embargo, el mecanismo por el cual este regulador estaría activando o reprimiendo genes que participen en la motilidad (tales como el mismo STY1408) de la bacteria es desconocido. No obstante, el mecanismo por el cual actúan reguladores pertenecientes a la familia ToxR - a la cual pertenece MarT (Blanc-Potard, *et al.* 1999; Tükel, *et al.* 2007) - es bien conocido. Estos se encuentran ubicados en la membrana interna de bacterias Gram negativo, las cuales son capaces de sensor una determinada condición y ejercer su acción regulatoria (Auger, *et al.* 1989; DiRita and

Mekalanos 1991). Dicha acción se logra gracias a la dimerización que estas proteínas sufren al ser expuestas a la condición de activación o represión. Tal es el caso de CadC - quien posee un 41% de similitud de secuencia aminoacídica con MarT (Blanc-Potard, *et al.* 1999) - una proteína que bajo condiciones de estrés ácido (pH 5.8) y un ambiente rico en lisina es capaz de regular positivamente la expresión del operón *cadBA* en *E. coli* (Auger, *et al.* 1989). CadC detecta indirectamente los niveles de lisina presente en el medio gracias a la acción de LysP, que es el responsable directo de sensar dichos niveles y que a bajas concentraciones de lisina interactúa con CadC impidiendo que este ejerza una activación transcripcional del operón *cadBA*. Ahora bien, en un ambiente rico en lisina, LysP se desacopla de CadC, permitiéndole a esta última ser estimulada por bajo pH y de esta manera activar la expresión del operón *cadBA*, el cual codifica para proteínas encargadas de la catabolización de lisina y la expulsión de cadaverina resultante de la decarboxilación de lisina (Figura 16) (Tetsch, *et al.* 2007; Dell, *et al.* 1994).



**Figura 16.- Modelo de regulación lisina dependiente de CadC sobre el operon *cadBA*** (tomado de Tetsch, *et al.* 2007)

Con estos antecedentes cabe destacar que MarT posee un 41% de similitud con CadC (Blanc-Potard, *et al.* 1999; Tükel, *et al.* 2007) y que, además, análisis *in silico* de este laboratorio no publicados, muestran que MarT posee dominios transmembrana al igual que CadC (Figura 17), sugiriendo que MarT podría tener un mecanismo de acción similar sobre los genes que regula, sensando indirectamente las condiciones bajo las cuales regula la transcripción de sus genes blanco mediante la formación de dímeros.



**Figura 17.- Predicción de segmentos transmembrana de CadC y MarT.** Se indican los segmentos transmembrana predichos mediante el programa DAS (Dense Alignment Surface). Este análisis se realizó para las proteínas CadC, ToxR y MarT. Se muestran dos líneas de corte sugeridas por el programa de análisis: una estricta (continua) y una relajada (segmentada). El punto que sobrepasa la línea continua indica que presenta un segmento transmembrana (Datos de este laboratorio no publicados).

#### 5.4. Regulón de MarT.

Si fijamos nuestra atención sólo en el STY1408 encontrado en este trabajo y, en una regulación negativa unidireccional de MarT sobre este gen, se podría esperar que una mutante *marT* incrementara la colonización a órganos profundos en una infección oral en ratones, dado que en una cepa STM  $\Delta marT::aph$  no se ejerce dicha regulación negativa, por lo tanto la expresión de STY1408 aumentaría, favoreciendo la colonización intestinal. Por el contrario, los resultados muestran que la cepa STM  $\Delta marT::aph$  posee un defecto en la colonización de hígado y bazo (Figura 15). Una explicación de esto puede encontrarse en la regulación positiva que ejerce MarT sobre *misL*, ya que al no estar presente el regulador, la adhesina MisL no es capaz de expresarse (Tükel, *et al.* 2007), lo que resultaría en un fenotipo hipoinvasivo en infecciones *in vivo*.

Por otro lado, y sumado a los ensayos *in silico* mostrados anteriormente en este trabajo, este defecto en la virulencia de una mutante *marT* en STM, también sugiere fuertemente que este regulador transcripcional podría tener otros genes dentro de su regulón que contribuyan a la patogenicidad de *Salmonella* que aún no han sido identificados.

## 6. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados reportados en esta Tesis concluimos que:

1. MarT participa en la regulación de la expresión de STY1408.
2. STY1408 está involucrado en la motilidad de *Salmonella*.
3. STY1408 participa en la virulencia *in vivo* de *Salmonella* Typhimurium.
4. *marT* contribuye a la patogenicidad de *Salmonella*.
5. MarT podría regular otros genes distintos a los reportados hasta ahora.

## 7. REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Arber, W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 1: 1-7.
- Auger, E.A., Redding, K.E., Plumb, T., Childs, L.C., Meng, S.Y. and Bennett, G.N. 1989. Construction of lac fusions to the inducible arginine- and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol.* 3(5): 609-20.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Beltran, P., Plock, S.A., Nelson, K. and Selander, R.K., 1993. *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. *J. Gen. Microbiol.* 139 (Pt 6): 1125–1132.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J. and Groisman, E.A. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 181(3): 998-1004.
- Bucarey, S.A., Villagra, N.A., Martinic, M.P., Trombert, A.N., Santiviago, C.A., Maulén, N.P., Youderian, P. and Mora, G.C. 2005. The *Salmonella enterica* serovar Typhi *tsx* gene, encoding a nucleoside-specific porin, is essential for prototrophic growth in the absence of nucleosides. *Infect Immun.* 73(10): 6210-6219.
- Contreras, I., Toro, C.S., Troncoso G. and Mora, G.C. 1997. *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiology\_143*(Pt 8): 2665-2672.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6; 97(12): 6640-5.
- Dell, C.L., Neely, M.N. and Olson, E.R. Altered pH and lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli* *cadBA* operon. *Mol Microbiol.* 14(1): 7-16.
- Deng W., Liou S. R., Plunkett Iii G., Mayhew G. F., Rose D. J., Burland V., Kodoyianni V., Sch-wartz D. C. and Blattner F.R. 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* 185 (7), 2330-2337.

- Diniz, M.M., Goulart, C.L., Barbosa, L.C., Farache, J., Lery, L.M., Pacheco, A.B., Bisch, P.M. and von Kruger, W.M. 2011. Fine-tuning control of *phoBR* expression in *Vibrio cholerae* by binding of PhoB to multiple *pho* boxes. *J. Bacteriol.* 193: 6929–6938.
- DiRita, V. J., and J. J. Mekalanos. 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* 64:29–37.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J.C. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology* 47(1): 103-118.
- Fuentes, J., Villagra, N., Castillo-Ruiz, M. and Mora, G.C. 2008. The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. 159(4): 279-87
- Goss, T.J., Morgan, S.J., French, E.L. and Krukonisa E.S. 2013. ToxR Recognizes a Direct Repeat Element in the *toxT*, *ompU*, *ompT*, and *ctxA* Promoters of *Vibrio cholerae* To Regulate Transcription. *Infect Immun* 81(3): 884–895.
- Goss, T.J., Seaborn, C.P., Gray, M.D. and Krukonis, E.S. 2010. Identification of the TcpP-binding site in the *toxT* promoter of *Vibrio cholerae* and the role of ToxR in TcpP-mediated activation. *Infect. Immun.* 78: 4122– 4133.
- Hurley, D., McCusker, M.P., Fanning, S. and Martins, M. 2014. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol.* 7;5:481
- Liu, Y., Harrison, P.M., Kunin, V. and Gerstein, M. 2004. Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol.* 5(9): R64
- Lux, R., Jahreis, K., Betyenbrock, K., Parkinson, J.S. and Lengeler, J.W. 1995. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 11583-11587.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. and Wilson, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413(6858): 852-856.

- Miller, V.L., Taylor R. K. and Mekalanos J. J. 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*. 48: 271–279.
- Moran, N.A. and Plague, G.R. 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Curr Opin Genet Dev*. 14(6):627-33
- Olsen, J.E., Hoegh-Andersen. K.H., Casadesús, J., Rosenkranzt, J., Chadfield, M.S, Thomsen, L.E. 2013. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiology*. 2013: 13-67
- Ortega, A.P., Villagra, N.A., Urrutia, I.M., Valenzuela, L.M., Talamilla-Espinoza, A., Hidalgo, A.A., Rodas, P.I., Gil, F., Calderón, I.L., Paredes-Sabja, D., Mora, G.C. and Fuentes, J.A. 2016. Lose to win: marT pseudogenization in *Salmonella enterica* serovar Typhi contributed to the surV-dependent survival to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and inside human macrophage-like cells. *Infect Genet Evol* 45: 111–121.
- Ottemnn, K.M. and Mekalanos, J.J. 1996. The ToxR Protein of *Vibrio cholerae* Forms Homodimers and Heterodimers. *J. Bacteriol*. 178: 156–162.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S.D., Holden, M.T., Sebahia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell B G. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413(6858): 848-852.
- Parkinson, J.S. 1993. Signal Transduction Schemes of Bacteria. *Cell*. 73: 857-871
- Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., Villagra, N.A., Morgado, J. and Mora, G.C. 2010. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing *S. Typhimurium* SPI-3 Sequences. *PloS one* 5(2): e9394.
- Rivera-Chávez, F., Winter, S.E., Lopez, C.A., Xavier, M.N., Winter, M.G., *et al.* 2013. *Salmonella* Uses Energy Taxis to Benefit from Intestinal Inflammation. *PLoS Pathog* 9(4): e1003267.
- Ryan, D., Ojha, U.K., Jaiswal, S., Padhi, C. and Suar, M. 2016. The Small RNA DsrA Influences the Acid Tolerance Response and Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Front. Microbiol*. 7: 599.



- Schmitt, C.K., Ikeda, J.S., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S. and O'Brien, A.D. 2001. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun.* 69(9): 5619-25.
- Shah, D.H. 2014. RNA Sequencing Reveals Differences between the Global Transcriptomes of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains with High and Low Pathogenicities. *Appl Environ Microbiol.* 80(3): 896-906
- Snavely MD, Miller CG, Maguire ME. 1991. The *mgtB* Mg<sup>2+</sup> transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem.* 15; 266(2): 815-23.
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I. and Jung, K. 2007. The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol.* 67(3): 570-83.
- Tükel, C., Akcelik, M., de Jong, M.F., Simsek, O., Tsolis, R.M. and Baumler, A.J. 2007. MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol* 189(10): 3922-3926
- Watson, J.D. and Crik, F.H. 1953. Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature.* 171: 737-738.