

**Análisis proteómico comparativo de aislamientos  
de *Salmonella enterica* de los serotipos Dublin y  
Enteritidis: en busca de los determinantes de la  
patogenicidad diferencial.**

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.**

**PEDECIBA**

**Área Biología, sub-área Microbiología**

**Licenciada Adriana Martínez Sanguiné.**

Tutora: Dra. Lucia Yim.

Co-tutora: Dra. Laura Betancor.

Departamento de Desarrollo Biotecnológico.

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina,

Universidad de la República.

**Montevideo, Uruguay, 2018.**

## RESUMEN.

Las infecciones por *Salmonella enterica* se encuentran entre las principales enfermedades transmitidas por alimentos en nuestro país y a nivel mundial. Son causadas por unos pocos serotipos que predominan ampliamente, los cuales son genéticamente muy similares pero difieren significativamente en el rango de hospedadores que infectan y la enfermedad que causan.

*Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) causa generalmente gastroenterocolitis autolimitada en humanos, e infecta un amplio rango de hospedadores. Por otro lado *Salmonella enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) generalmente infecta ganado vacuno, pero en los casos en que infecta humanos causa en general una enfermedad invasiva, produciendo cuadros de alta morbi-mortalidad.

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar los factores moleculares involucrados en la determinación de comportamientos patogénicos diferenciales entre aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* de los serotipos Dublin y Enteritidis.

Mediante un análisis proteómico comparativo entre dos aislamientos de cada serotipo, crecidos en un medio sintético que imita las condiciones encontradas en el intestino de mamíferos se identificaron 9 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis* y 7 sobre-representadas en *S. Enteritidis*. La mayoría de los genes analizados mostraron diferencias en sus niveles de ARNm entre ambos serovares, apoyando los resultados de la proteómica.

Interesantemente, *S. Dublin* el serovar más invasivo produce mayores niveles de proteínas reportadas como involucradas en la respuesta a estrés ácido, oxidativo y osmótico entre otros, o sobre-expresadas en estas condiciones, comparado con *S. Enteritidis*. *Salmonella* se expone a estas condiciones en su ciclo de vida dentro del hospedador, por ejemplo cuando se encuentra en el lumen del intestino o cuando es internalizada en células fagocíticas. Además, la supervivencia dentro del fagosoma es relevante para la invasividad, dado que está reportado que es a través de estas células que *Salmonella* se disemina a órganos internos.

Con el fin de profundizar en el rol que cumplen las proteínas identificadas, seleccionamos 3 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* involucradas en la respuesta a estrés (Dps, YciF e YgaU). Mediante la construcción de mutantes nulos en estas proteínas, demostramos que tienen un rol en la invasividad de *Salmonella* en modelos animales. También seleccionamos una proteína sobre-representada en *S. Enteritidis* que participa en el metabolismo de aminoácidos (carbamato kinasa, CK, codificada por el gen *arcC*). Sin embargo, en el modelo murino de salmonelosis empleado en este trabajo, no observamos efecto en la invasión de los mutantes nulos en *arcC* con respecto a la cepa salvaje, en ninguno de los dos serovares.

Por otro lado, en este trabajo, se evaluó el rol que pudieran desempeñar dos posibles transportadores de arginina en la invasividad de *S. Dublin*. La proteína ArtI, anotada como un transportador de arginina de tipo ABC localizado en el periplasma, había sido previamente descrita por nuestro grupo de trabajo como enriquecida en los subproteomas de superficie de aislamientos de *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis*. Se construyeron por tanto mutantes nulos en *artI* en una cepa de cada serovar, los cuales se evaluaron en el modelo murino de salmonelosis. Los resultados indican que el mutante nulo para *artI* en *S. Dublin* es significativamente menos invasivo que la cepa salvaje, sin embargo en *S. Enteritidis* la diferencia entre mutante y parental no fue significativa. Además, analizando los genomas de *Salmonella enterica* disponibles en la base de datos encontramos un gen denominado *artJ* que está anotado con la misma función que *artI*. Análisis de RTqPCR revelaron que en *S. Dublin*, cuando el gen *artI* está anulado, los niveles de ARNm para *artJ* aumentan significativamente en comparación con la cepa salvaje, no ocurriendo lo mismo en *S. Enteritidis*. Estos resultados sugieren redundancia en las funciones de ArtI/ArtJ y una mayor relevancia de la función que cumplen estos genes en el serovar Dublin respecto a *S. Enteritidis*.

Por lo tanto, en este trabajo encontramos diferencias significativas en los proteomas de ambos serovares en condiciones relevantes para la infección. Es destacable que Dublin el serovar más invasivo produce mayores niveles de proteínas involucradas en la respuesta a estrés comparado con Enteritidis. Estas proteínas demostraron tener un rol en la invasividad de *Salmonella* en modelos animales, lo cual podría contribuir a las diferencias en patogenicidad observadas entre ambos serovares.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Un agradecimiento muy especial a las Dras. Lucia Yim y Laura Betancor por la buena predisposición ya fuera para planificar actividades o para la discusión de resultados y por el buen trato para conmigo en todo momento.

Al Dr. Alejandro Chabalgoity por permitirme trabajar en el Departamento de Desarrollo Biotecnológico.

A la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo por permitirme realizar allí una pasantía donde aprendí las técnicas de electroforesis bidimensional y Espectrometría de masas. En especial a Madelón Portela, Analía Lima, Bernardina Rivera, Carlos Batthyány y Rosario Durán.

A las instituciones financiadoras: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que me financio la beca de Maestría y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) que financió los proyectos de los cuales forma parte esta tesis.

A PEDECIBA Biología que financió las alícuotas de Maestría y la pasantía en UByPA

A la Sociedad Uruguaya de Microbiología por la financiación a congreso que fue parte de mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio (grupo Salmonella y a todos en general), por sus aportes en las discusiones de resultados, su ayuda en diferentes momentos de la parte experimental y los buenos momentos vividos juntos extra estudio.

A Guy Tejedor por su ayuda y buena disposición en la manipulación de ratones.

A mis amigas Carolina y G10 por su apoyo anímico en todo momento.

Muy especialmente a mi familia, mi madre, hermano y David por su apoyo en todo sentido.

Y un agradecimiento muy especial a Sofía, por ser el motor de mi vida, ser una muy buena bebe, lo cual me permitió culminar esta tesis de Maestría.

Dedico esta tesis a mi padre, que desde algún lugar me está mirando.

# Índice

<b>Capítulo 1.- Introducción y objetivos.....</b>	<b>8</b>
1.1- Taxonomía y epidemiología de la especie <i>Salmonella enterica</i> .....	8
1.2- Patogénesis de las infecciones por <i>Salmonella</i> .....	10
1.3.- Incidencia de infecciones invasivas causadas por <i>Salmonella</i> no tifoidea (SNT).....	11
1.4.- <i>Salmonella enterica</i> serovares Enteritidis y Dublin.....	12
1.5.- Estudios de proteómica en <i>Salmonella</i> .....	16
1.6.- Antecedentes del grupo de trabajo.....	17
1.7.-Hipótesis y objetivos.....	22
<b>Capitulo 2.- Materiales y Métodos.....</b>	<b>23</b>
2.1.- Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	23
2.2- Proteómica comparativa.....	27
2.2.1 Puesta a punto del crecimiento de las cepas en condiciones GMC.....	27
2.2.2.- Obtención de extractos proteicos.....	27
2.2.2.1 -Proteínas totales.....	27
2.2.2.2- Proteínas de superficie.....	28
2.2.3.- Electroforesis bidimensional.....	28
2.2.3.1.- Isoelectroenfoco.....	28
2.2.3.2.- Electroforesis bidimensional, tinción de los geles y análisis.....	29
2.2.4.- Análisis de los spots por Espectrometría de masas (Maldi TOF/TOF).....	30
2.3.- Construcción de mutantes nulos en genes seleccionados.....	31
2.3.1-Obtención de productos de PCR híbridos.....	31
2.3.2- Transformación de cepa receptora SDU5 con los productos de PCR híbridos.....	32
2.3.3- Verificación de la sustitución de los genes a anular por el cassette de resistencia.....	33
2.3.4 -Transducción de las mutaciones en una nuevas cepas.....	33
2.3.4.1.- Preparación de lisados de fago P22 sobre los mutantes nulos SDU5 de los 4 genes seleccionados.....	33
2.3.4.2 - Transducción de mutantes simples en los genes <i>dps</i> , <i>yciF</i> , <i>ygaU</i> y <i>arcC</i> hechos en SDU5 en S. Enteritidis 8/02 y S. Dublin SDU3.....	34
2.3.4.3.- Verificaciones de los mutantes.....	34
2.4.- Análisis de los niveles de ARNm bacterianos.....	35
2.4.1.-Extracción de ARN.....	35
2.4.2.- Tratamiento con DNAsa.....	35
2.4.3.- Transcripción inversa.....	35
2.4.4.- PCR cuantitativa en Tiempo Real (RTqPCR).....	35

2.5.- Ensayos para probar fenotipo de mutantes.....	36
2.5.1.- Supervivencia a estrés oxidativo.....	36
2.5.2.- Respuesta a estrés osmótico.....	37
2.6.- Evaluación de mutantes <i>in vitro</i> .....	37
2.6.1.- Ensayos de internalización y supervivencia en macrófagos.....	37
2.7.- Evaluación de mutantes <i>in vivo</i> .....	38
2.8.- Análisis estadísticos.....	39
<b>Capítulo 3.- Resultados.....</b>	<b>40</b>
Resultados de proteómica comparativa.....	40
3.1.- Puesta a punto del crecimiento de <i>Salmonella</i> en medio de cultivo y condiciones que imitan el intestino de mamíferos (GMC).....	40
3.2.- Puesta a punto de la técnica de electroforesis bidimensional.....	40
3.3.- Proteómica comparativa entre <i>S. Dublin</i> y <i>S. Enteritidis</i> en condiciones GMC.....	42
3.4.- Expresión de genes que codifican para las proteínas identificadas por EM en la aproximación proteómica, en GMC y en medio rico LB.....	46
3.5.- Expresión del factor sigma alternativo RpoS.....	51
3.6.- Construcción de mutantes nulos y verificaciones.....	52
3.7.- Fenotipo de mutantes.....	56
3.7.1.- Ensayos de resistencia a estrés oxidativo.....	56
3.7.2 Ensayos de resistencia a estrés osmótico (KCI).....	58
3.8.- Evaluación de la invasividad de mutantes simples y dobles en ensayos de competencia en el modelo murino de salmonelosis invasiva.....	59
Resultados de análisis de ArtI/ArtJ.....	62
3.9.- Evaluación del posible rol de ArtI en la invasividad de <i>Salmonella</i> .....	62
3.9.1.- Niveles de ARNm para <i>artI</i> en <i>S. Dublin</i> y <i>S. Enteritidis</i> .....	63
3.9.2.- Construcción de mutantes nulos en el gen <i>artI</i> y evaluación en el modelo murino de salmonelosis.....	63
3.9.3.- Evaluación <i>in vitro</i> de los mutantes nulos <i>artI</i> .....	64
3.9.4.- Análisis de los niveles de ARNm para el gen <i>artJ</i> en <i>S. Dublin</i> y <i>S. Enteritidis</i> .....	66
<b>Capitulo 4.- Discusión.....</b>	<b>70</b>
4.1- Proteómica comparativa y análisis de niveles de ARNm.....	70
4.2.- Proteínas sobre-representadas en <i>S. Dublin</i> con respecto a <i>S. Enteritidis</i> .....	71
4.3.- Proteínas sobre-representadas en <i>S. Enteritidis</i> con respecto a <i>S. Dublin</i> .....	76
4.4.- Factor sigma alternativo RpoS.....	79
4.5.- Análisis de ArtI y ArtJ.....	82
<b>Capítulo 5.- Conclusiones y Perspectivas.....</b>	<b>85</b>
Perspectivas.....	86

<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>99</b>

## Capítulo 1.- Introducción y objetivos.

### 1.1- Taxonomía y epidemiología de la especie *Salmonella enterica*.

La salmonelosis es una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a nivel mundial; habiéndose reportado 154 millones de casos de salmonelosis no tifoidea por año y 120.000 muertes (Kirk *et al.*, 2015), y un estimado de 17,8 millones de casos de fiebre tifoidea en países de bajos y medianos ingresos (Antillón *et al.*, 2017). Según datos de FoodNet (EEUU), considerando el conjunto de los patógenos que causan ETA, *Salmonella* es el agente con mayor incidencia y responsable del mayor número de muertes (Huang, 2016; Marder *et al.*, 2017). En Uruguay, *Salmonella* es el principal agente causal de ETA, siendo responsable de más del 50% del total de los brotes registrados por el Ministerio de Salud Pública entre 1998 y 2011 (Taller vigilancia ETA 2011, MSP). Durante el año 2016 el MSP registró 47 brotes de ETA que afectaron 663 personas. De los 25 brotes en los que se logró identificar el agente causal, la amplia mayoría (18 brotes) corresponde a *Salmonella enterica* (MSP, 2017).

El género *Salmonella* es extremadamente diverso y consta de más de 2.500 serovares comprendidos en dos especies (*Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*). A su vez la especie *enterica* se subdivide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Bäumler *et al.*, 1998). A pesar de la cantidad de serovares existentes, la salmonelosis es generalmente causada por unos pocos serotipos de la especie *enterica* subespecie *enterica*, que predominan ampliamente. Los serovares Enteritidis y Typhimurium son los más prevalentes a nivel mundial y en nuestro país también (Freitas Neto *et al.*, 2010; Hendriksen *et al.*, 2011; Marder *et al.*, 2017). Datos del Centro Nacional de *Salmonella* (CNS, Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene), indican que del total de aislamientos estudiados en los últimos 10 años, el 46% corresponden al serovar Enteritidis, mientras que Typhimurium corresponde al 26%.

De acuerdo a la enfermedad que causan en el ser humano, los serovares de *Salmonella enterica* se pueden clasificar en:

- 1) Tifoideos, que son aquellos que causan una enfermedad grave sistémica denominada fiebre tifoidea. Este grupo es causa de altas tasas de morbilidad y mortalidad en áreas pobres en higiene. Aproximadamente 22 millones de casos son diagnosticados por año resultando en más de 433.000 muertes en todo el mundo (Crump, Luby and Mintz, 2004; Buckle, Walker and Black, 2012). La ingestión de agua contaminada es la principal causa de infección. La fiebre tifoidea es una enfermedad poco común en países desarrollados y en nuestra región también. Casi todos los casos se asocian a viajes internacionales (de Jong *et al.*, 2012). La fiebre tifoidea es causada por un grupo de serovares restringidos al humano o primates (*Salmonella enterica* serovares Typhi, Paratyphi A, B y C y Sendai (Selander *et al.*, 1990)).



2) No tifoideos (SNT), que son el resto de los serotipos, causan en el humano generalmente gastroenterocolitis autolimitada, aunque en algunos casos que dependen de condiciones como el estado inmune del hospedero, la virulencia de la cepa y la carga bacteriana ingerida, pueden traspasar la mucosa intestinal y diseminarse a órganos internos provocando una infección sistémica. En Uruguay, la gran mayoría de los casos de salmonelosis se deben a SNT debido a que pueden entrar fácilmente a la cadena alimenticia ya que infectan asintómicamente a hospederos animales de consumo humano (Keestra-Gounder, Tsolis and Bäumlér, 2015). La diversidad de posibles reservorios de este microorganismo implica desafíos importantes para las autoridades de salud pública en la búsqueda de controlar estas infecciones (Dione *et al.*, 2011).

Otra forma de clasificar los serovares de *Salmonella enterica* es según el rango de hospedero que infectan: 1) Ubicuos, que infectan una gran variedad de hospedadores, como es el caso de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

2) Adaptados a hospedador, que infectan un número restringido de especies. En este grupo se encuentran *S. Dublin* y *S. Choleraesuis*, los cuales están adaptados al hospedero bovino y suino respectivamente, pero son capaces de infectar también a humanos.

3) Específicos de un hospedador como *S. Typhi* o *S. Gallinarum* que infectan una única especie (el hombre o las aves respectivamente).

En general los serovares ubicuos causan en el humano gastroenteritis aguda autolimitada mientras que los adaptados y los específicos de hospedero se asocian con mayor frecuencia a casos de bacteriemia y enfermedad sistémica con focos extraintestinales de infección (Uzzau *et al.*, 2000).

Los factores bacterianos que determinan la adaptación a un determinado hospedero es un área de gran estudio (Encheva *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el grado de adaptación de ciertos serovares a un hospedador determinado está directamente relacionado con el grado de degradación de genes específicos. El número de pseudogenes (genes que tienen una mutación que produce un codón stop prematuro o cambio de marco de lectura por ejemplo) es mayor en aquellos serovares con rango restringido o específicos de hospedador (Thomson *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2009; Betancor *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013; Langridge *et al.*, 2015; Matthews *et al.*, 2015).

Además, diferencias funcionales entre variantes alélicas de proteínas bacterianas probablemente contribuyen a la adaptación a diversos hospederos (Yue *et al.*, 2015).

La pérdida de genes necesarios para el estilo de vida gastrointestinal conduce hacia un estilo de vida sistémico y a la exclusión de nichos en serovares específicos de determinados hospederos (Matthews *et al.*, 2015).

## 1.2- Patogénesis de las infecciones por *Salmonella*.

*Salmonella* ingresa al organismo por vía oral, generalmente debido al consumo de alimentos o agua contaminada. Solo una pequeña proporción de las bacterias ingeridas son capaces de sobrevivir al pH ácido del estómago y acceder al intestino. La interacción de los distintos serotipos de *Salmonella* con la mucosa intestinal del hospedador dicta en gran medida la evolución clínica de la enfermedad (gastroenteritis localizada versus invasión sistémica) (Raffatellu *et al.*, 2008; Sebastian E. Winter *et al.*, 2010; Langridge, Wain and Nair, 2012; Wangdi, Winter and Bäumler, 2012; Keestra-Gounder, Tsois and Bäumler, 2015). Al interactuar con el epitelio intestinal *Salmonella* puede acceder a la lámina propia a través de células especializadas denominadas M. A su vez *Salmonella* es capaz de invadir los enterocitos por un mecanismo de endocitosis mediado por la bacteria y desencadenar una reacción inflamatoria aguda caracterizada por la secreción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias por parte de las células epiteliales, pérdida de iones cloro, reclutamiento de neutrófilos, transmigración de los mismos a través del epitelio, activación de macrófagos, los cuales contribuyen a aumentar la respuesta inflamatoria, y secreción de péptidos antimicrobianos al lumen intestinal (Winter *et al.*, 2010 A). Todos estos procesos producen daño tisular, pasaje de fluidos hacia el lumen y se traducen en síntomas de diarrea (Haraga, Ohlson and Miller, 2008). Está generalmente aceptado que la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria contribuye a mantener la infección localizada en la mucosa intestinal. Sin embargo algunos serotipos particularmente invasivos generan una respuesta inflamatoria atenuada, y luego de traspasar la barrera intestinal pueden ser internalizados en células fagocíticas (macrófagos o células dendríticas) por inducción de una macropinocitosis, sensar el ambiente fagosomal y activar mecanismos de virulencia para lograr sobrevivir en el ambiente microbicida de la célula fagocítica (Haraga, Ohlson and Miller, 2008). Este ambiente se caracteriza por acidificación del pH, limitación de metales esenciales, presencia de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y de péptidos antimicrobianos. La capacidad de *Salmonella* de sobrevivir a estas condiciones es esencial para su diseminación a órganos internos, generando en consecuencia una enfermedad invasiva (Ilyas, Tsai and Coombes, 2017). Este es el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhi la cual produce una infección con un período de incubación de hasta 2 semanas derivando en bacteriemia e infección sistémica con pocos o ningún síntoma a nivel intestinal. La ausencia de una robusta inflamación intestinal y la falta de transmigración de neutrófilos se postula que facilita la invasión por parte de serovares tifoideos de tejidos profundos del intestino y la diseminación a sitios sistémicos (Gal-Mor, Boyle and Grassl, 2014). Varios estudios reportan los mecanismos empleados por este serovar que le permiten evadir la respuesta inflamatoria y de esta manera diseminarse a

órganos internos. Algunas de las estrategias son la producción de una cápsula por la actividad de genes codificados en una isla de patogenicidad, conocida como antígeno Vi, la cual le permite la protección frente a receptores de reconocimiento de patrones del hospedero y es sobre-expresada cuando entra en contacto con la mucosa intestinal. Nickerson y colaboradores estudiaron los cambios en los perfiles transcripcionales de tejido intestinal humano antes y después de la infección con *S. Typhi*, y encontraron que esta bacteria influye en la disminución de la expresión de genes involucrados en vías de reconocimiento y presentación de antígenos entre otras vías y por lo tanto impide la activación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal del hospedador durante las primeras dos horas de la infección (Nickerson *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado la inhibición de la expresión de flagelina, una importante molécula proinflamatoria, cuando *S. Typhi* entra en contacto con el epitelio intestinal (Sebastian E. Winter *et al.*, 2010). Por otro lado *S. Typhi* expresa dos serina-threonina kinasas similares a las humanas, que le permiten la supervivencia dentro de macrófagos, paso clave en la patogénesis de esta bacteria (Theeya *et al.*, 2015).

### **1.3.- Incidencia de infecciones invasivas causadas por *Salmonella* no tifoidea (SNT).**

Algunos serovares de SNT son capaces de causar enfermedad invasiva. Los grupos de mayor riesgo son los niños, ancianos e inmunocomprometidos (Ao *et al.*, 2015). En nuestro país, entre 2010 y 2013, entre el CNS y el MSP se tipificaron 1068 aislamientos humanos de *Salmonella* de los cuales 178 (17%) fueron obtenidos de hemocultivos (Dra. Algorta, CNS y Dra. T. Camou, MSP). En los últimos 5 años, (2013 al 2017) de un total de 292 aislamientos de origen humano caracterizados por el CNS, 47 provenían de hemocultivos (16%).

Cuando se consideran globalmente, la mayoría de los casos humanos de salmonelosis invasiva están causados por los mismos serotipos que predominan como causa de gastroenteritis (Enteritidis y Typhimurium en la mayoría de las regiones del mundo, incluido nuestro país) (Hendriksen *et al.*, 2011; Ao *et al.*, 2015; Al-Emran *et al.*, 2016). Sin embargo, ciertas serovariedades que causan infecciones en el hombre con menor frecuencia que las predominantes, parecen tener una clara tendencia a producir enfermedad invasiva. Esto se hace evidente cuando se calcula el índice de invasividad del serotipo, como el porcentaje de aislamientos obtenidos a partir de hemocultivos, con respecto al total de aislamientos para ese serotipo (Jones *et al.*, 2008; Langridge, Wain and Nair, 2012). Para el caso de *S. Enteritidis*, el índice de invasividad varía en las diferentes regiones del mundo con un promedio de 1.8 % mientras que para *S. Dublin* tiene un promedio de 33% (Threlfall, Hall and Rowe, 1992; Fernandes *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Langridge, Wain and Nair, 2012). Basándonos en datos del Centro Nacional de *Salmonella* (CNS), el panorama en nuestro país parece ser similar:

entre los años 1975 y 2009, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron responsables del 78% de los aislamientos clínicos de *Salmonella*, pero su índice de invasividad fue bajo (21 y 13,5% respectivamente), mientras que del serotipo Dublin o Choleraesuis son muy pocas las cepas aisladas de humanos (0,9% del total entre los dos), pero de éstas el 75 y 89% respectivamente, provienen de enfermedades sistémicas. Entre los años 2009 y 2017 los índices de invasividad de los serovares *Typhimurium* y *Enteritidis* en nuestro país fueron 12,5 y 14,8% respectivamente (Fuente: CNS, datos no publicados). Las infecciones invasivas tienen tasas mayores de morbilidad y mortalidad que las infecciones intestinales (Behravesch *et al.*, 2011). Los factores bacterianos responsables del desarrollo de enfermedad invasiva por SNT son poco conocidos. Uno de los factores posiblemente asociados es la alta degradación genómica observada en los serovares invasivos de SNT, como Choleraesuis y Dublin.

En este sentido, en los últimos años se han reportado nuevos linajes de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* asociados con enfermedad invasiva en África sub-Sahariana (Kingsley *et al.*, 2009; Okoro *et al.*, 2012, 2015; Rodríguez *et al.*, 2012; Feasey *et al.*, 2016; García *et al.*, 2018) en poblaciones con una alta prevalencia de enfermedades inmunosupresivas como VIH, malaria y mal nutrición. Estudios genómicos indican que dichas cepas poseen mayor número de pseudogenes y pertenecen a un tipo genético diferente al de las cepas de *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* diseminadas globalmente y mayormente causantes de enfermedad entérica (Kingsley *et al.*, 2009; Feasey *et al.*, 2016).

#### **1.4.- *Salmonella enterica* serovares Enteritidis y Dublin.**

*S. Enteritidis* (fórmula antigénica: O: 1, 9, 12: gm: -) y *S. Dublin* (O:1, 9, 12: gp: -) son dos serotipos que comparten propiedades antigénicas, y si bien están estrechamente relacionados filogenéticamente (Figura 1), presentan un comportamiento patogénico significativamente diferente. *S. Enteritidis* causa en el humano generalmente gastroenteritis autolimitada mientras que *S. Dublin* usualmente infecta ganado vacuno causando abortos y enfermedad sistémica, y en las raras ocasiones en que infecta al humano (por contacto con animales infectados o consumo de leche o productos lácteos contaminados), con frecuencia se trata de casos de enfermedad invasiva con alta tasa de morbi-mortalidad (Freitas Neto *et al.*, 2010; Hendriksen *et al.*, 2011).



*Salmonella enterica* serovar Enteritidis hasta mediados de la década del 90 del siglo pasado se aislaba muy raramente en nuestro país, pero a partir de un primer brote importante en el año 1995 pasó a ser el serovar predominante en los casos humanos de salmonelosis en Uruguay. En Europa y Estados Unidos este serotipo se hizo prevalente una década antes que en nuestro país (Rodrigue, Tauxe and Rowe, 1990; Guard-Petter, 2001). Es el serovar más comúnmente encontrado en huevos y tiene la capacidad de sobrevivir en la clara de éstos (Guan, Grenier and Brooks, 2006; Baron *et al.*, 2016), razón por la cual el consumo de huevos mal cocidos ha causado brotes de este serovar en diversos países (Jackson *et al.*, 2013). Los productos derivados de aves de corral son considerados la mayor ruta de infección de humanos por este serotipo de *Salmonella* (Shah *et al.*, 2012).

Por otro lado, *S. Dublin* se aísla raramente de humanos, aunque se han reportado brotes de infecciones por este serovar en varios países incluidos algunos de altos ingresos, con elevadas tasas de morbi-mortalidad (Mohammed *et al.*, 2016). Jones y colaboradores reportan datos de los serovares implicados en infecciones por *Salmonella* en EEUU (década 1996-2006), indicando que los casos por *S. Enteritidis* representaron un 16,2% de los totales por *Salmonella*, y de estos un 20,6% resultaron en hospitalizaciones, un 6,7% en enfermedad invasiva y un 0,5% en muerte. Sin embargo los casos por *S. Dublin* representaron un 0,2% del total, pero de éstos un 67,0 % resultaron en hospitalizaciones, 64,0 % en enfermedad invasiva y un 3% en muerte (Jones *et al.*, 2008). Las bases genéticas de la elevada virulencia de este serovar están poco caracterizadas.

En este sentido, Mohammed y colaboradores estudiaron mediante secuenciación masiva los genomas de un conjunto de aislamientos clínicos de *S. Dublin* provenientes de enfermedad invasiva y no invasiva, y realizaron un estudio genómico comparativo entre *S. Dublin* y la cepa de referencia de *S. Enteritidis*, P125109 (PT4), encontrando varios factores de virulencia que podrían contribuir a aumentar la virulencia del serovar Dublin. Encontraron que todos los aislamientos de *S. Dublin* son lisogénicos para el profago Gifsy-2 y portan el gen que codifica para la proteína Gifsy-2 con función de adherencia, (en la cepa de *S. Enteritidis* PT4, el profago Gifsy-2 está degradado y la proteína está parcialmente delecionada), sugiriendo que este profago podría estar asociado a la mayor predisposición de *S. Dublin* para causar enfermedad sistémica en humanos. Dentro de los factores de virulencia que podrían contribuir a la virulencia de *S. Dublin* identificaron a GGT ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase) que se ha reportado que contribuye a la virulencia de *Helicobacter pylori* (Gong *et al.*, 2010) y juega un papel importante en la inhibición de la proliferación de células T (Schmees *et al.*, 2007). El gen *ggt* se encontró presente en los genomas de *S. Dublin* incluidos aislamientos de humanos y animales. Otro factor de virulencia presente en todos los aislamientos de *S. Dublin* que estudiaron fue PagN que codifica

para una proteína de membrana externa y se ha reportado que contribuye a la virulencia de *S. Typhimurium* mediante la adhesión a células de mamíferos (Lambert and Smith, 2008), sugiriendo su rol en la virulencia e invasividad en *S. Dublin*. En ese mismo trabajo Mohammed y colaboradores encontraron que todos los aislamientos de *S. Dublin* portaban las islas de patogenicidad SPI-6 y SPI-19 que codifican para dos sistemas de secreción de tipo 6 (SST6). SPI-19 se encuentra degradado en *S. Enteritidis* PT4. Se ha visto que los T6SS juegan un rol importante en la patogénesis funcionando como maquinarias para la inyección de factores de virulencia dentro de las células del hospedero (Kapitein and Mogk, 2013). Sin embargo, los autores no encontraron marcadores que pudieran diferenciar dentro del serovar *Dublin* aislamientos invasivos de los no invasivos (Mohammed *et al.*, 2016, 2017).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha reportado la contribución del flagelo a la respuesta inflamatoria montada contra *S. Dublin* y se sugiere que la ausencia de éste podría contribuir a la diseminación sistémica mediante la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Yim *et al.*, 2014; Sasías *et al.*, 2017).

En este trabajo, elegimos a los serovares *Dublin* y *Enteritidis* como modelos de serovares muy estrechamente relacionados a nivel genético pero con importantes diferencias a nivel de la enfermedad que causan, para el elucidar posibles factores bacterianos determinantes del fenotipo invasivo de *SNT*. La caracterización de los determinantes moleculares que puedan dar una base teórica a las diferencias en la patogenicidad entre estos dos serovares resulta de gran interés, ya que no solo puede permitir explicar la mayor capacidad invasiva o epidémica de cepas particulares de *Salmonella*, sino que además las conclusiones obtenidas podrán generar hipótesis a ser evaluadas en otras especies bacterianas de interés médico.

### **1.5.- Estudios de proteómica en *Salmonella*.**

La proteómica tiene por objetivo realizar un análisis global de las proteínas celulares producidas en un momento dado y bajo determinadas condiciones ambientales. La introducción durante la última década de nuevas técnicas basadas en espectrometría de masas (EM) ha abierto nuevos enfoques para evaluar y comprender el proteoma de los sistemas hospedador-patógeno (Kamaladevi, Marudhupandiyan and Balamurugan, 2017). Avances en este campo nos han permitido explorar aspectos más allá de la genómica y la transcriptómica. A menudo la abundancia en los niveles de un ARNm determinado no refleja la abundancia de la proteína resultante debido a la regulación post traduccional y a las modificaciones post traduccionales que cada proteína puede sufrir tales como clivaje, fosforilación, lipidación, glicosilación, etc, hasta alcanzar su estado funcional maduro. Por estas razones la proteómica es de gran utilidad para proporcionar pistas útiles sobre el estado funcional de un sistema biológico.

Existen dos estrategias proteómicas basadas en EM denominadas *top-down* y *bottom-up*.

En la primera se analizan las proteínas intactas, preservándose de esta manera la información relacionada con la proteína intacta, incluidas modificaciones post- traduccionales. Desafortunadamente, dado que la diversidad fisicoquímica de las proteínas intactas es mucho mayor que la de los péptidos, la separación de estas a gran escala es un gran desafío. Por lo tanto las estrategias *top-down* tradicionalmente se focalizan en el análisis de una o pocas proteínas, típicamente obtenidas mediante purificación por afinidad.

En la estrategia *bottom-up* las proteínas son en principio digeridas y la información de los péptidos resultantes obtenida por EM es usada para inferir la identidad, cantidad y las modificaciones de las proteínas en la muestra.

Una de las aproximaciones experimentales para estudiar comparativamente los proteomas celulares, dentro de esta última estrategia mencionada, es la visualización de los perfiles de proteínas mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales. Alternativamente, los extractos proteicos pueden ser digeridos con una proteasa de sitio específico como la tripsina y posteriormente se separan por columna en cromatografía líquida HPLC. Luego de definidos los posibles marcadores específicos de las distintas condiciones que se están comparando, se pueden aislar e identificar las proteínas/péptidos de interés mediante digestión y análisis por EM en tándem y comparación con las secuencias aminoacídicas disponibles en las bases de datos genómicas (Chao and Hansmeier, 2012; Gregorich, Chang and Ge, 2014).

Así, el estudio del proteoma de *Salmonella* crecida bajo condiciones que simulan el ambiente de su hospedador, diversas condiciones de estrés o inclusive aislada de los propios tejidos



infectados ha permitido identificar numerosas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con la adaptación de la bacteria a esas condiciones (Becker *et al.*, 2006; Rodland *et al.*, 2008). Por ejemplo Wang y colaboradores compararon el perfil proteómico de *S. Typhimurium* y *S. Typhi* y encontraron un grupo de proteínas que se expresan específicamente según el serovar, las cuales podrían ser utilizadas como biomarcadores para identificar serotipos. Encontraron además que la expresión del flagelo y la quimiotaxis está sub-expresada en *S. Typhi* en comparación con *S. Typhimurium* así como diferencias en la expresión de genes involucrados en metabolismo y transporte de aminoácidos y carbohidratos entre ambos serovares (Wang, Huang and Huo, 2014).

Analizando la bibliografía disponible se observa que los estudios proteómicos de *Salmonella* publicados se refieren en general al serovar Typhimurium y utilizan cepas de laboratorio altamente manipuladas y mutantes derivados. Se han estudiado factores involucrados en la resistencia a múltiples antibióticos, a variadas condiciones de estrés y en su interacción con el hospedador en variados modelos *in vitro* (Encheva *et al.*, 2007; Sonck *et al.*, 2009; Ansong *et al.*, 2013; Collado-Romero *et al.*, 2015; Pérez-Llarena and Bou, 2016).

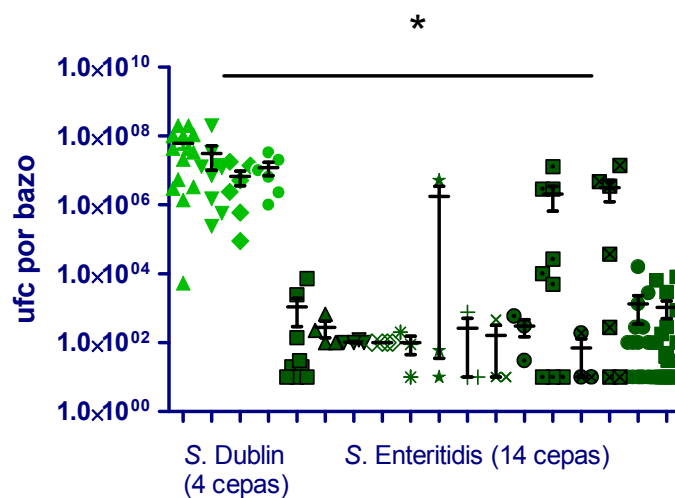
Sin embargo, existen escasos trabajos donde analicen comparativamente los perfiles proteicos de aislamientos naturales de *Salmonella* y de serotipos alternativos a Typhimurium.

#### **1.6.- Antecedentes del grupo de trabajo.**

Nuestro grupo de trabajo se dedica desde hace años al estudio tanto genómico como fenotípico de aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos en Uruguay. La estrecha colaboración con el Centro Nacional de *Salmonella* (CNS) nos ha permitido contar con una gran cantidad de aislamientos de *Salmonella* de diversos orígenes (humano y no humano) y períodos de tiempo.

Hace algunos años aplicando la técnica de CGH (Comparative Genomics Hybridization, usando microarreglos de DNA), se realizó un estudio de genómica comparativa entre un conjunto de cepas de *S. Dublin* y de *S. Enteritidis*, aisladas de casos humanos de salmonelosis en Uruguay y se comparó la predicción de presencia/ausencia de genes para cada uno de los serotipos. Los resultados mostraron 33 genes (4 regiones genéticas más algunos genes aislados) propios del serovar Enteritidis y 87 genes específicos del serovar Dublin distribuidos en 6 regiones genéticas y algunos genes aislados. Por otra parte se realizó una comparación en la composición de pseudogenes entre los genomas disponibles públicamente en ese momento y se detectó un número mucho mayor de pseudogenes en los genomas de *S. Dublin* que en los de *S. Enteritidis* (309 frente a 111), sugiriendo que el mecanismo de acumulación de pseudogenes puede ser importante en el proceso de adaptación al hospedador en *S. Dublin*.

(Betancor et al., 2012). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación también se han centrado en el análisis de las propiedades patogénicas de aislamientos nacionales de los serotipos Enteritidis y Dublin. Entre los años 2006-2009 se evaluaron 14 cepas de *S. Enteritidis* y 4 de *S. Dublin*, aisladas de diferentes períodos y orígenes en un modelo murino de salmonelosis. Sietes días después de la infección oral con *Salmonella*, se cuantificó el número de bacterias en los bazos de los animales infectados observándose que *S. Dublin* era significativamente más invasiva que Enteritidis, reproduciendo este resultado lo observado para estos serotipos en el hospedador humano (Figura 2).



**Figura 2.** Grupos de ratones Balb/C fueron infectados con  $2-5 \times 10^6$  UFCs de *S. Dublin* (verde claro) o *S. Enteritidis* (verde oscuro) por vía oral. 7 días post- infección se sacrificaron los animales y se cuantificaron UFCs en homogeneizado de bazos. \* Diferencia significativa entre grupos (Mann Whitney test  $p < 0.05$ ). (Tesis de doctorado Laura Betancor, 2010).

También se observó que aislamientos del serotipo Dublin obtenidos de enfermedad invasiva generan una menor respuesta inflamatoria intestinal respecto a aislamientos del serotipo Enteritidis, lo cual en parte puede ser explicado por la ausencia de flagelina en la superficie de los primeros (Sasías et al., 2017). En este sentido, se encontró que los aislamientos clínicos de *S. Dublin* obtenidos de enfermedad invasiva carecían de flagelo y generaban respuestas inflamatorias significativamente menores en células humanas intestinales en cultivo así como en el intestino de ratones infectados comparados con los aislamientos de gastroenteritis (Yim et al., 2014). Asimismo, se descubrió el mecanismo responsable del fenotipo aflagelado en aislamientos de *S. Dublin* derivados de infecciones invasivas y se reportó una inusual proporción de aislamientos de este serovar carentes de flagelo (Sasías et al., 2017). Estos resultados sugieren una tendencia a la pérdida de flagelo en *S. Dublin* y una contribución de la represión del flagelo al fenotipo invasivo de este serovar.

Más recientemente se realizó un estudio genómico comparativo entre ambos serovares analizando las secuencias genómicas completas de 14 aislamientos uruguayos de *S. Dublin* y más de 50 de *S. Enteritidis*. Los resultados corroboraron la cercanía filogenética entre estos dos serotipos, que difieren en aproximadamente el 7% de su contenido de genes, estando las principales diferencias relacionadas a profagos, además de a numerosos genes que codifican para funciones metabólicas y estructuras de superficie. Además, en concordancia con resultados previos y de otros investigadores, confirmamos que el serovar Dublin presenta un número mucho mayor de pseudogenes que Enteritidis (Betancor *et al.*, 2012; Nuccio and Bäumler, 2014). El análisis comparativo de las regiones no codificantes reveló 33 genes con diferencias nucleotídicas relevantes en las posibles regiones promotoras, y estudios de RTqPCR confirmaron expresión diferencial entre ambos serovares para 7 genes (Tabla 1). Remarcablemente, estos 7 genes demostraron expresarse en niveles significativamente mayores en todas las cepas del serovar Dublin analizadas respecto a las de Enteritidis, crecidas en condiciones que imitan el intestino del hospedador. El estudio del posible rol de algunos de estos genes en la mayor capacidad invasiva exhibida por *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis* en el modelo murino de salmonelosis invasiva está en curso (datos no publicados).

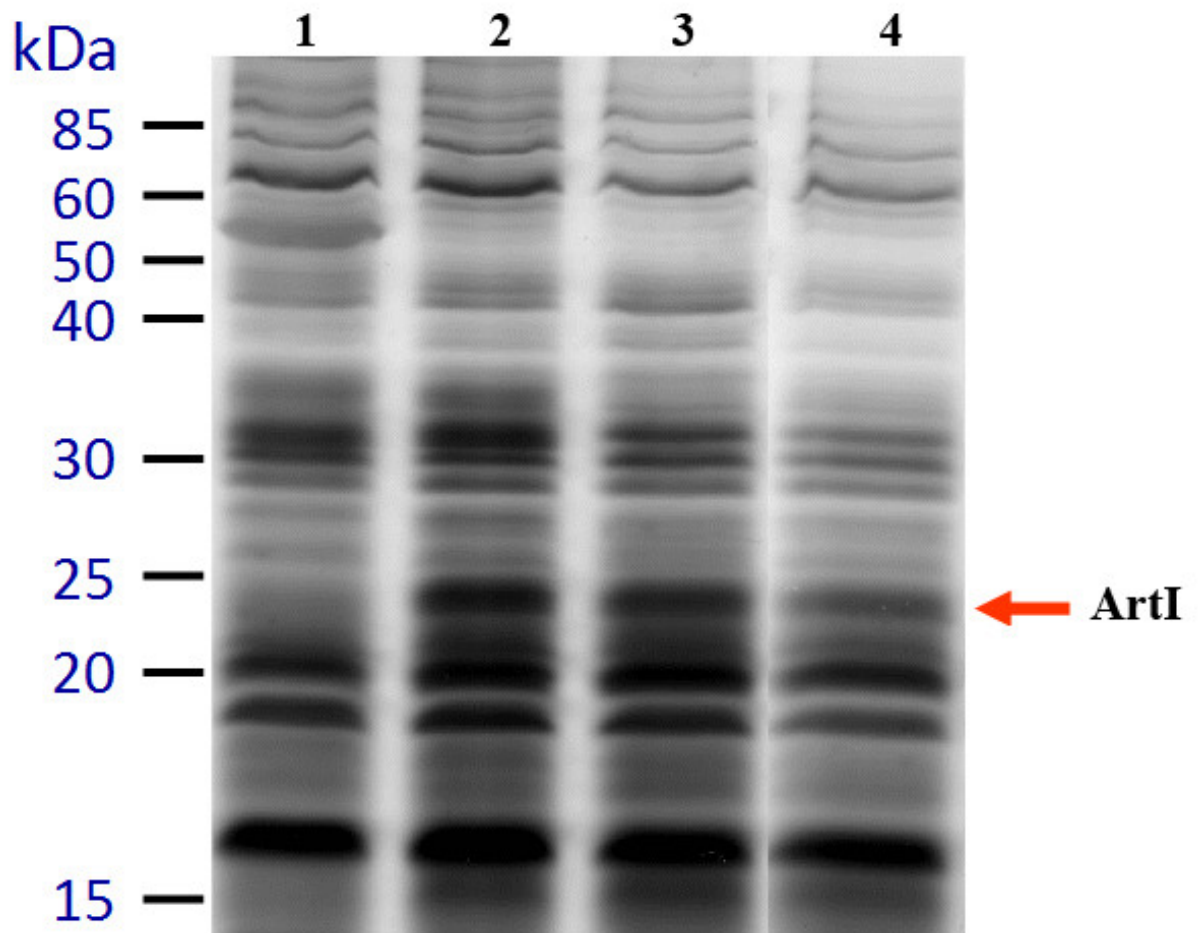
**Tabla 1.** Genes sobre-expresados en las cepas de *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis*. Locus tag indica la posición del gen correspondiente en el genoma de la cepa de referencia *S. Enteritidis* PT4.

locus tag (PT4)	gen	Producto
SEN0554	fepA	ferric-enterobactin receptor precursor (tonB dependent receptor). Outer membrane enterobactin receptor, TonB siderophore receptor.
SEN0603	ybeF	lysR-family transcriptional regulator
SEN0787	ybiU	conserved hypothetical protein
SEN1073	ftnB	ferritin-like protein
SEN1455	ugtL	putative membrane protein
SEN2065	sopA	secreted protein SopA
SEN2145B	pegA	putative fimbrial subunit protein

Asimismo, nuestro grupo de investigación previamente analizó los subproteomas de proteínas de superficie de aislamientos de los serotipos Dublin y Enteritidis crecidos *in vitro* en medio de cultivo rico, mediante geles de SDS-PAGE y demostró la existencia de una proteína diferencialmente expresada entre ambos serotipos, la cual postulamos que podría estar implicada en las diferencias patogénicas observadas (Figura 3). Esta proteína se identificó por EM como ArtI (anotada como un transportador de arginina de tipo ABC, localizado en el periplasma) y se encuentra presente en los aislamientos invasivos de *S. Dublin*, pero ausente en los del serotipo Enteritidis. Esta proteína es particularmente interesante, dado que la L-arginina es sustrato de la enzima iNOS, involucrada en producir especies reactivas del

nitrógeno (óxido nítrico) hacia el fagosoma, generando así un ambiente que inhibe el crecimiento bacteriano (Lowenstein, 2004). Hipotetizamos que el transporte activo de arginina al interior de *Salmonella* actuaría secuestrando dicho aminoácido del medio, limitando su disponibilidad para la enzima iNOS. En la presente tesis se mostrarán avances en el estudio de esta proteína.

En base a todos estos antecedentes, en este trabajo nos planteamos averiguar qué factores bacterianos pudieran estar implicados en la determinación de los distintos fenotipos invasivos exhibidos por los serovares Dublin y Enteritidis de *Salmonella enterica*, aplicando el modelo murino de salmonelosis invasiva para su evaluación.



**Figura 3.** SDS PAGE de extractos de superficie de proteína bacteriana. Se cargaron 10 $\mu$ g de extractos proteicos. Carril 1: aislamiento 251/01 representativo de *S. Enteritidis* (todos los analizados dieron idéntico perfil), carriles 2, 3 y 4: aislamientos SDU1, SDU2 Y SDU3 respectivamente, representativos de *S. Dublin*.

## **1.7.-Hipótesis y objetivos**

Existen proteínas que se producen diferencialmente entre los serotipos Dublin y Enteritidis de *Salmonella enterica*, algunas de las cuales tienen un rol en la patogenicidad diferencial observada entre ambos serotipos.

### **Objetivo general:**

Elucidar posibles factores involucrados en la determinación de comportamientos patogénicos diferenciales entre cepas bacterianas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* de los serotipos Dublin y Enteritidis.

### **Objetivos Específicos:**

1-Comparar los proteomas de dos aislamientos de cada serovar (Enteritidis y Dublin) cultivados en un medio de cultivo que simule las condiciones intestinales, e identificar por EM las proteínas diferencialmente representadas.

2-Complementar los resultados de proteómica por medio del análisis de los niveles de ARNm de los genes codificantes, por RTqPCR, a partir de bacterias crecidas en las mismas condiciones usadas para los ensayos proteómicos.

3-Seleccionar un conjunto acotado de genes que demuestren expresarse diferencialmente entre ambos serotipos, inactivarlos mediante reemplazamiento génico y evaluar su rol en la patogenicidad en el modelo murino de salmonelosis.

4-Evaluar el rol de *artI* en la invasividad en el modelo murino de salmonelosis y en la supervivencia

## Capítulo 2.- Materiales y Métodos.

### 2.1.- Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Los aislamientos de *Salmonella* utilizados fueron obtenidos del Centro Nacional de *Salmonella* (Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdeLaR) y de la Unidad de Microbiología del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (Ministerio de Salud Pública) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Aislamientos salvajes de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* empleados en este trabajo y cepa de referencia de *S. Enteritidis*

cepa bacteriana	Año de aislamiento	Origen	Serotipo
SDU1	1995	Sangre humana	S. Dublin
SDU2	2004	Sangre humana	
SDU3	2006	Sangre humana	
SDU4	2008	Sangre humana	
SDU5	2000	Heces humana	
SDU6	2005	Heces humana	
SDU7	2008	Sangre humana	
31/88	1988	Heces humanas	S. Enteritidis
8/89	1989	Sangre humana	
53/94	1994	Alimento	
206/99	1999	Alimento	
251/01	2001	Huevo	
8/02	2002	Heces humana	
214/02	2002	Sangre humana	
10/05	2005	Heces humana	
P125109 (PT4) (Thomson et al., 2008)			

Las cepas se mantuvieron creciendolas en medio LB (Luria Bertani, modificación de Miller) o LBA (LB con 1.5% de agar) en condiciones de aerobiosis (200 rpm), a 37°C y con el agregado de antibióticos cuando fue requerido (kanamicina (50µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml).

Para las pruebas de movilidad de las cepas se utilizó LBA con 0,3% de agar (agar de movilidad) y para la preparación de lisados bacterianos usados en las transducciones se utilizó LBA con 0,7% agar (top agar).

Los reactivos utilizados son de la marca Sigma a no ser que se especifique lo contrario.

Para la proteómica comparativa y el análisis de expresión de genes diferencialmente representados entre serotipos se utilizó un medio de cultivo que imita las condiciones intestinales (GMC, por las siglas en inglés “gut mimicking conditions”) (Lawhon *et al.*, 2002; Sonck *et al.*, 2009). Este medio de cultivo consiste en LB suplementado con 25mM de acetato

de sodio, 3µM de deoxicolato de sodio, 0,2M NaCl (sumado al NaCl que contiene el LB da un total de 0,37M), pH 7. Además, los tubos se incubaron a 37°C sin agitación, para lograr condiciones de baja aerobiosis.

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

Plásmido	Características	Referencias
pKD3	Vector conteniendo el gen <i>cat</i> flanqueado por dos sitios FRT y secuencias P1 y P2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Datsenko KA and Wanner BL, 2000).
pKD4	Vector conteniendo el gen <i>aph(3')</i> (amino O- fosfotransferasa) flanqueado por dos sitios FRT y secuencias P1 y P2, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> . (Datsenko KA and Wanner BL, 2000).	(Datsenko KA and Wanner BL, 2000)
pKD46	Vector conteniendo los genes del sistema Red de la recombinasa del fago lambda ( $\gamma$ , $\beta$ y <i>exo</i> ) bajo control del promotor de arabinosa P <sub>araB</sub> . Replicón termosensible, Amp <sup>R</sup> (Datsenko KA and Wanner BL, 2000).	(Datsenko KA and Wanner BL, 2000)

**Tabla 4.** Cepas mutantes construidas en este trabajo

cepa	Características	Referencias
SDU3 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>dps</i> sustituido por un cassette de resistencia a cloranfenicol	Presente trabajo
SDU3 <i>yciF</i> ::km <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>yciF</i> sustituido por un cassette de resistencia a kanamicina	
SDU3 <i>ygaU</i> ::km <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>ygaU</i> sustituido por un cassette de resistencia a kanamicina	
SDU3 <i>arcC</i> ::cm <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>arcC</i> sustituido por un cassette de resistencia a cloranfenicol	
SDU3 <i>artI</i> ::cm <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>artI</i> inactivado por un cassette de resistencia a cloranfenicol	
SDU3 <i>artJ</i> ::cm <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con el gen <i>artJ</i> inactivado por un cassette de resistencia a kanamicina	
SDU3 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>yciF</i> ::km <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con los genes <i>dps</i> e <i>yciF</i> inactivados por cassettes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	
SDU3 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>ygaU</i> ::km <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con los genes <i>dps</i> e <i>ygaU</i> inactivados por cassettes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	
SDU3 <i>artI</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>artJ</i> ::km <sup>R</sup>	S. Dublin (SDU3) con los genes <i>artI</i> y <i>artJ</i> inactivados por cassettes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	
8/02 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>dps</i> sustituido por un cassette de resistencia a cloranfenicol	
8/02 <i>yciF</i> ::km <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>yciF</i> sustituido por un cassette de resistencia a kanamicina	
8/02 <i>ygaU</i> ::km <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>ygaU</i> sustituido por un cassette de resistencia a kanamicina	
8/02 <i>arcC</i> ::cm <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>arcC</i> sustituido por un cassette de resistencia a cloranfenicol	
8/02 <i>artI</i> ::cm <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>artI</i> inactivado por un cassette de resistencia a cloranfenicol	
8/02 <i>artJ</i> ::cm <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con el gen <i>artJ</i> inactivado por un cassette de resistencia a kanamicina	
8/02 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>yciF</i> ::km <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con los genes <i>dps</i> e <i>yciF</i> inactivados por cassettes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	
8/02 <i>dps</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>ygaU</i> ::km <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con los genes <i>dps</i> e <i>ygaU</i> inactivados por un cassette de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	
8/02 <i>artI</i> ::cm <sup>R</sup> / <i>artJ</i> ::km <sup>R</sup>	S. <i>Enteritidis</i> (8/02) con los genes <i>artI</i> y <i>artJ</i> inactivados por cassettes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina respectivamente	



**Tabla 5.** Cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	secuencia (5'--> 3')	Aplicación	Referencias
SEN0776P1 SEN0776P2	CTTATTTTCGTTAATTACCTGGGACACAAACATCAAGAGGAT ATGAGATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG GCTGCGTTTGTACCTTCCTGCAACTCGAAGTATTCAGGGTAG AGATAGATATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>dps</i>	Presente trabajo
SEN1305P1 SEN1305P2	AATCTGCGAGTCTTCTGGCTCGCAATATTTTGCCAGGAGAA TTAGATTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG ATCTGCTCCGATAATAAAAATCGGAATCATGCAAGCTGATAAT TAAAAATAATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>yciF</i>	
SEN2639P1 SEN2639P2	TCCCTCTGCTACACTTTTCTTTGTGTGATTTTTGACAAGCGA GGTGAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG TTCGCCAGGCGATGGCAGGGAAAATGTAGCCTGGCGCGACC TGATAGCCAATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>ygaU</i>	
SEN4217P1 SEN4217P2	ACGCTGCATGAGCTGTCCACTGGAACGCGATGGTATTTAAA GGAGACGTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG GGGGTGTAGTCAAGCAGCTTCAAAAAGTTACGATTTTTAGT GAAATAACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>arcC</i>	
artIP1 artIP2	ACCGAAGCGTTCAAAAACATCTCTCTCACTAAGATTGCGGA CAATGACATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG GCAAGGCCGACGGTCATCCCGCGCGCTTGCTAAAGGAAA AAATTCGTTTCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>artI</i>	
artJP1 artJP2	ATCTAAGCCGACACACGGCGCATAATCATAAGATTACGGG AGTCACATCTGTGTAGGCTGGGAGTCGTCTCG ATAGTTTTCCGATGGCGGCCCGTGGGCTGAATAAGGTATTTAT ACTGCCATCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT	Construcción de mutante nulo para <i>artJ</i>	
P1 P2	TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG CATATGAATATCCTCCTTAGTTC	Construcción de mutantes	(Datsenko KA and Wanner BL, 2000)
dps_F dps_R	TCATGCAGAATATCACCTCGTT CCAGGCAGGGGTATAGGGAT	Verificación de mutante nulo en gen <i>dps</i>	Presente trabajo
yciG_F yciE_R	AAAAAGCATCTGAAGCGGGC TCAATACGGCTGGCCATAGA	Verificación de mutante nulo en gen <i>yciF</i>	
SEN2640_F SEN2638_R	AGGAAAAGGGTTTCGGTTGGG GCCCGCTACCGCTTTATTTG	Verificación de mutante nulo en el gen <i>ygaU</i>	
SEN4218_F SEN4216_R	CAATAACGTGCTCACCTGC ATCAGCGCGATGTTTTTGCC	Verificación de mutante nulo en gen <i>arcC</i>	
artP F artQ R	TACCGCTCAAATCGTCAGCA AGACGGCAAAGAACATGGCT	Verificación de mutante nulo en gen <i>artI</i>	
artM F artJ R	ATGGTCGTACCTACGATGTGG CCGTGGGCTGAATAAGGTATT	Verificación de mutante nulo en gen <i>artJ</i>	
C1b C2	CGATTACAGTTCATCATGC GATCTTCCGTCACAGGTAGG	Verificación de mutantes	(Datsenko KA and Wanner BL, 2000)
K1 K2	CAGTCATAGCCGAATAGCCT CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Verificación de mutantes	
SEN1305P_F SEN1305P_R	AATGCTCGACTTTTTGCGCC GTCGCTATGGAAGGGCTGAT	RTqPCR ( <i>yciF</i> )	Presente trabajo
SEN1304P_F SEN1304P_R	GGCATGTTCCCTTCGATGA TCGGAATTGAGCAGTGTGCG	RTqPCR ( <i>yciE</i> )	
SEN4163P_F SEN4163P_R	AATCCGGTCTTGAAGGGCTG GTCCGCACGCTCATGAATTT	RTqPCR ( <i>fkfB</i> )	Presente trabajo
SEN2639P_F SEN2639P_R	AAATAGCGCTCAGGGTGTGCG TAGCAGCGTTGACGATCAGG	RTqPCR ( <i>ygaU</i> )	
SEN4171P_F SEN4171P_R	CTTTGTTCCGCCCAAATCA GCGCATTTGCGGCACATATT	RTqPCR ( <i>cpdB</i> )	

SEN4216P_F SEN4216P_R	CCAGCAGGTGGTAAACGCTA CCATTTTCGATTTTCGCGTCCC	RTqPCR ( <i>arcB</i> )
SEN4217P_F SEN4217P_R	CTGATTAGCCGCGATCACCT TCTTTGTGCATCACCCGCCTC	RTqPCR ( <i>arcC</i> )
SEN4218P_F SEN4218P_R	CTTGACACCGTCATGACCCA GCTCTCCTGGGTTTCGTTTCA	RTqPCR ( <i>arcA</i> )
SEN0776P_F SEN0776P_R	AGGCACCACGCAAGTTATCA GTAGCGATCGGCCAGTTCTT	RTqPCR ( <i>dps</i> )
SEN2199P_F SEN2199P_R	ATGTGCTGAGCGATGACTCC TCACTTTGCTTCTCGCCCAT	RTqPCR ( <i>dps</i> )
SEN0524P_F SEN0524P_R	CCTGAATGACTGCGATCCGA CAGAGGAGACAGCCAGCAAA	RTqPCR ( <i>fruF</i> )
SEN1303P_F SEN1303P_R	GCGAAGTCACAGCCGATCTA TCTTTTACGCCGGGATCGTC	RTqPCR ( <i>katN</i> )
SEN1715P_F SEN1715P_R	AGAGAAAGCCTGAAGCCGTC GTCAGGACCAATAACGCCGA	RTqPCR ( <i>lpxR</i> )
SEN2791P_F SEN2791P_R	ATCGACCTGGACGGTACTGA CTCGTACAGCGGCATACCTT	RTqPCR ( <i>eno</i> )
SEN3420P_F SEN3420P_R	CCAGCCGTACCGCGTATATT TTTTGGCATCGACAAAGCGG	RTqPCR ( <i>gor</i> )
SEN4323P_F SEN4323P_R	GCGCTGGTAGACCATGACAA TTCTACGCCTTTCGCCACTT	RTqPCR ( <i>osmY</i> )
icdA-F icdA-R	GGTATCGGTGTTGATGCACTCC CATCCTGGCCGTAAACCTGTGTGG	RtqPCR ( <i>icdA</i> )
rpoS-F rpoS-R	GCTTAACCGTGACGTCGAGA AATCGCCCGTTTCGATTGTCT	RtqPCR ( <i>rpoS</i> )
artI_F artI_R	CACGGCGGTCTGACCGAAT TGCAGCTCGGTGTTGCCCTG	RtqPCR ( <i>artI</i> )

Tabla 5.- (continuación)

## 2.2- Proteómica comparativa.

Para llevar a cabo la proteómica comparativa se seleccionaron 2 aislamientos del serotipo Enteritidis (8/02 y 251/01) y 2 aislamientos del serotipo Dublin (SDU3 Y SDU5), tomando como criterio de selección las diferencias en el origen y en las características fenotípicas de los aislamientos intra-serotipo (Tabla 6).

Tabla 6. Origen y características fenotípicas de aislamientos.

Aislamientos naturales	Origen	Movilidad	invasión en Caco-2	respuesta inflamatoria en ciego de ratones y en células Caco-2	sobrevivencia en clara de huevo
SEn 8/02	heces humanas	+	+		+
SEn 251/01	huevo	-	-		-
SDU3	sangre humana	-		-	
SDU5	heces humanas	+		+	

### 2.2.1 Puesta a punto del crecimiento de las cepas en condiciones GMC.

Para decidir en qué momento colectar las bacterias para la obtención de extractos proteicos y extracción de ARN, se hicieron curvas de crecimiento de los aislamientos seleccionados. Brevemente se sembró una colonia aislada en 3 ml de LB y se incubó a 37°C, 14-16 hs., sin agitación (Lawhon *et al.*, 2002; Sonck *et al.*, 2009). Luego se diluyeron los cultivos 1/50 en medio GMC, se incubaron nuevamente a 37°C, sin agitación y se midió a distintos intervalos de tiempo la D.O 600nm. Se graficó la D.O<sub>600nm</sub> vs el tiempo en minutos y se definió el punto de la curva para colectar las bacterias de modo de que estuvieran en fase exponencial tardía en todos los casos.

## **2.2.2.- Obtención de extractos proteicos.**

### **2.2.2.1 -Proteínas totales.**

Para la obtención de los extractos proteicos totales y su posterior análisis por electroforesis bi-dimensional de proteínas, las bacterias se crecieron en medio GMC como se describió en la puesta a punto y se colectaron las bacterias en fase exponencial de crecimiento. Luego se realizó un lavado con Tris-HCl 25 mM pH 8, luego una centrifugación a 2716 g, 10°C, 10 minutos y se resuspendió el pellet en buffer de lisis (7 M urea, 2 mM thiourea, 10 mM Tris-HCl pH 8, 4% CHAPS) (2-D Electrophoresis, Principles and Methods, GE Healthcare). Luego de incubar las muestras 1 hora en hielo, se realizó un congelado a -80°C y descongelado rápidamente seguido de una sonicación de 5 segundos (4 veces manteniendo en hielo 1min entre cada sonicación).

Luego se centrifugó a 13000 g y se guardó el sobrenadante (extracto proteico) a -80°C.

### **2.2.2.2- Proteínas de superficie.**

Por otro lado los extractos de proteínas de superficie los obtuvimos a partir de bacterias crecidas en fase exponencial según el protocolo de Nicholas y Cullen, (Nicholas y Cullen, 1991) con algunas modificaciones. Brevemente el cultivo se centrifugó a 1600 g durante 25 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con Tris- HCl 25mM pH8 y una resuspensión final en buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril. A continuación se incubaron las bacterias por 1 hora a 65 °C. Luego de una última centrifugación a 1000 g, 15 min a 15°C se guardó el sobrenadante que es el que contiene las proteínas de la envoltura.

Se obtuvieron extractos proteicos de los 2 aislamientos seleccionados de cada serotipo, en 2 experimentos independientes para los extractos totales y de la misma forma para los extractos proteicos de superficie y se cuantificaron con el Kit 2D Quant, (Amersham Biosciences) adaptando el protocolo del fabricante para realizarlo en placas de 96 pocillos.

En el siguiente paso, que consiste en la separación de los extractos proteicos por electroforesis bidimensional, se analizaron 50µg de cada extracto proteico total y 20 µg de los extractos proteicos de superficie, por lo tanto estas cantidades se trataron con el kit 2D-Clean-up (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante, para remover sustancias que puedan interferir con los análisis posteriores de EM.

### **2.2.3.- Electroforesis bidimensional.**

Esta técnica al igual que la técnica de Espectrometría de Masas, se puso a punto en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo, en una pasantía llevada a cabo por la autora de esta tesis. La electroforesis bidimensional permite la separación de las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes (punto isoeléctrico y masa molecular), en dos diferentes pasos.

#### **2.2.3.1.- Isoelectroenfoque.**

La primera dimensión consiste en el isoelectroenfoque (IEF) para lo cual utilizamos Immobiline™ Dry Strips (GE Healthcare), las cuales fueron cargadas con los 50µg de extractos proteicos previamente tratados con el kit 2D-Clean-up. Cada Immobiline™ Dry Strip se rehidrató con 50µl de solución de rehidratación (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.002% de azul de bromophenol, 17mM DTT y 0,5% IPG buffer) y 200µl de destreak solution (Amersham Biosciences), durante 12-14hs a temperatura ambiente cubiertas con aceite mineral (fluid cover, Amersham Biosciences).

Se utilizó el equipo Ettan IPGPhor 3 para el IEF y el programa consistió en 4 pasos 1) 300 V constante, 30 min.; 2) 1000 V en gradiente, 30 min.; 3) 5000 V en gradiente, 80 min y 4) 5000 V constante, hasta 2000 V/h a 20°C. Se probaron 2 rangos de pH diferentes (3-11 no lineal y 4-7).

#### **2.2.3.2.- Electroforesis bidimensional, tinción de los geles y análisis.**

Luego de terminada la corrida de la primer dimensión las Immobiline™ Dry Strips se equilibraron 15 minutos en la solución (6M urea, 75 mM Tris-HCl pH8.8, 29.3% v/v glicerol, 2% SDS, 0.002% (w/v) de azul de bromophenol) adicionando DTT (10 mg/ml) y luego con los mismos ingredientes pero sustituyendo el DTT por iodoacetamida (25 mg/ml) otros 15 minutos antes de proceder a realizar la segunda dimensión de la electroforesis. Este procedimiento se realiza para preservar el estado reducido de las proteínas y prevenir la re oxidacion de los grupos tioles durante la electroforesis, de esta manera se evita la heterogeneidad que se puede dar por la oxidación de las cisteinas durante la preparación de la muestra.

La segunda dimensión consiste en la separación de las proteínas según su masa molecular relativa. Las Immobiline™ Dry Strips fueron posicionadas sobre geles de 12% de poliacrilamida en presencia de SDS y se separaron en cubetas estándar de electroforesis (15 min a 10 mA por gel y el resto de la corrida a 20mA por gel). El marcador de peso molecular utilizado fue prestained protein ladder, broad range (10-230 kDa) BioLabs Inc.

#### Tinción de los geles de poliacrilamida.

Se probaron también tres tipos de tinciones para los geles. Por un lado evaluamos el uso del colorante Coomassie coloidal. Por otro lado evaluamos en paralelo la tinción con nitrato de plata y SYPRO® RUBY.

#### Tinción con Coomassie coloidal:

El protocolo utilizado es el reportado por Dyballa y Metzger, (2009) (Dyballa and Metzger, 2009), el cual consiste en un lavado de los geles con agua Milli Q durante 10 minutos justo después de terminar de correr la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional. Seguidamente incubamos los geles toda la noche con agitación, en solución de coomassie (0.02% (w/v) de CBBG250 (Sigma), 5% (w/v) sulfato de aluminio, 10% (v/v) etanol 96%, 2% (v/v) ácido ortofosfórico 85% (J.T. Baker)).

#### Tinción con nitrato de plata:

El protocolo de tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata comienza con un paso de fijación con una solución de ácido acético 12%, etanol 50%, formalina 0.05% , durante 1 hora y seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado (etanol 50%) . Luego los geles se sensibilizan con una solución de tiosulfato de sodio 0.02% seguido de 3 lavados ídem paso anterior. A continuación los geles se incuban 20 minutos con solución de tinción (nitrato de plata 0.2%, formalina 0.075%), seguido de 3 lavados ídem pasos anteriores y se incuban con solución de revelado (carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0.02%, formalina 0.05%) hasta visualizar los spots a simple vista. Finalmente se incuban con solución de terminación (ácido acético 5%) y la solución de conservación consiste en ácido acético 1%.

#### Tinción con SYPRO® RUBY

La tinción con este colorante luminiscente la hicimos según las indicaciones del fabricante, que consisten en un primer paso de fijación durante 1 hora con una solución 50% metanol y 7% ácido acético, cambiando por solución de fijación nueva a los 30 minutos. Luego se incubaba toda la noche con solución de SYPRO® RUBY. Al otro día se lavan los geles durante 30 minutos con solución de lavado (10% metanol, 7% ácido acético).

Los geles fueron escaneados en un analizador de imágenes G-BOX (Syngene).

Se compararon los geles correspondientes a dos experimentos independientes utilizando las cepas de *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) y las cepas de *S. Dublin* (SDU3 y SDU5), ocho geles en

total . Se seleccionaron aquellos spots (manchas observadas en los geles bidimensionales, que por lo general se corresponden con una proteína), que estuvieran presentes o sobre-representados en los 4 geles de un serotipo y no estuvieran o su intensidad fuera evidentemente menor en los 4 geles del otro serotipo (observando la intensidad de la coloración de los spots), para analizarlos por EM.

#### **2.2.4.- Análisis de los spots por Espectrometría de masas (Maldi TOF/TOF).**

Los spots elegidos fueron recortados de los geles correspondientes.

Para desteñir cada segmento de gel recortado, correspondiente a un spot, se lavó con una mezcla 1+1 vol/vol de 30 mM K<sub>3</sub>(FeCN<sub>6</sub>) y 100 mM de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dos veces y dos veces más con agua Milli Q. Luego se agregó a cada muestra 0.2 M de bicarbonato de sodio y se agitó por 20 minutos. Posteriormente se le agregó acetonitrilo hasta que se observaron los segmentos de gel deshidratados.

La digestión proteolítica se realizó incubando las muestras con tripsina (sequence grade, Promega) en 50 mM de bicarbonato de amonio, pH 8.3, toda la noche (relación enzima-sustrato 1:10).

La extracción de los péptidos se realizó incubando cada muestra 1 hora con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA)/60% acetonitrilo (J.T. Baker). Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Se juntaron ambas extracciones, se concentraron en un speed vacumm y se desalaron usando micro columnas C18 de fase reversa (Omix®*Tips*, Varian).

Los péptidos eluidos fueron mezclados con una solución de matriz CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) en 60% (v/v) de acetonitrilo con 0.1% (v/v) de TFA e inyectados en el espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems).

El espectro de masas de las muestras digeridas fue realizado en el modo reflector, calibrado externamente con una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Las proteínas fueron identificadas utilizando la base de datos NCBI nr usando la búsqueda con los valores de  $m/z$  y  $m/z$  y el programa MASCOT (Matrix Science [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)), con los siguientes parámetros pre-seleccionados: Mass value: Monoisotopic; Peptide MassTolerance :  $\pm 0.08$  Da; Fragment Mass Tolerance:  $\pm 0.4$  Da; Max Missed Cleavages : 1; modificaciones variables carbamidometilación (C) y oxidación (M).

#### **2.3.- Construcción de mutantes nulos en genes seleccionados.**

##### **2.3.1-Obtención de productos de PCR híbridos.**

La construcción de los mutantes nulos individuales en los 4 genes (*dps*, *yciF*, *ygaU* y *arcC*) que codifican para las proteínas diferencialmente representadas entre *S. Dublin* y *S. Enteritidis* se realizó mediante la técnica de inactivación de genes en un solo paso descrita por (Datsenko KA and Wanner BL, 2000). De la misma manera se inactivaron los genes *artI* y *artJ*. Mediante esta técnica los genes que se quieren inactivar son sustituidos por un cassette de resistencia a kanamicina o cloranfenicol.

Para la anulación de cada gen se comenzó amplificando por PCR en tiempo final, los cassettes de cloranfenicol o kanamicina de los plásmidos pKD3 o pKD4 respectivamente usando los cebadores P1 (forward) y P2 (reverse) (Datsenko KA and Wanner BL, 2000).

Luego se diseñaron cebadores específicos para cada gen que queríamos anular fusionando la secuencia de los primers P1 y P2 a las regiones adyacentes a los genes a inactivar, de modo de obtener por PCR el cassette de resistencia antibiótica fusionado a las regiones adyacentes al gen a inactivar (50 pb de la región adyacente al gen a inactivar por el extremo 5' fueron fusionadas a P1 y 50 pb adyacentes a este mismo gen por el extremo 3' se fusionaron a P2).

De este modo, por PCR utilizando como molde el cassette de resistencia a antibiótico elegido y estos cebadores se obtuvieron amplicones híbridos formados por el cassette fusionado a las regiones adyacentes al gen que queremos anular.

Para los genes *dps*, *arcC* y *artI* se eligió construir los mutantes con resistencia a cloranfenicol y para *yciF*, *ygaU* y *artJ* se eligió la resistencia a kanamicina. La elección de diferentes resistencias se debió a la posibilidad de construir más adelante dobles mutantes que fueran resistentes a los dos antibióticos.

Los amplicones resultantes fueron separados en geles de agarosa y la banda correspondiente al tamaño esperado fue recortada del gel y el ADN extraído con kit QIAEX II (Qiagen).

### **2.3.2- Transformación de cepa receptora SDU5 con los productos de PCR híbridos.**

El ADN obtenido en el paso anterior se transformó en células electrocompetentes de *S. Dublin* SDU5 (previamente transformada con el plásmido pKD46 que contiene la Red recombinasa del fago clonada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa), la cual permite reemplazar el ADN híbrido por el gen que queremos anular mediante recombinación homóloga (Datsenko KA and Wanner BL, 2000).

Las células electrocompetentes de SDU5 portando el plásmido pKD46 se obtuvieron a partir de un cultivo ( $D.O_{600nm} \sim 0,5-0,6$ ), crecido con agitación a 200 rpm en 150 ml de LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y adicionado con el inductor L-arabinosa (10 mM) cuando la  $D.O_{600nm}$  luego de 1 h de incubación. La temperatura de crecimiento fue de 30°C ya que el plásmido pKD46 es incapaz de replicarse a mayores temperaturas. Luego de unos minutos en hielo se hicieron

varios lavados centrifugando a 5000 rpm, 10 minutos, 4°C y se resuspendió el pellet en cantidades decrecientes de agua Milli Q fría. El último lavado se realizó con glicerol 10% estéril y frío hasta una resuspensión final en 360µl de glicerol 10% estéril y frío.

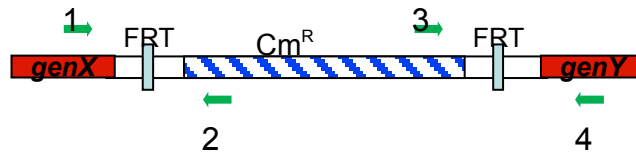
Las electroporaciones se realizaron mezclando 60µl de células electrocompetentes con 3 µl de ADN (aproximadamente 100ng/µl). Inmediatamente después del pulso eléctrico (1750 V, 50 mA, 89 W, 40 µF, 500 Ω), mediante electroporador (Bio-Rad), se le agregó 0,94 ml de LB precalentado y se incubó 2 horas a 37°C (temperatura a la cual el plásmido pKD46 no se replica) y 200 rpm de agitación. Finalmente se centrifugaron 500 µl de la transformación, se resuspendió el pellet en 100µl de LB y se sembró en LBA con kanamicina (50µg/ml) o cloranfenicol (25µg/ml) (según el cassette de resistencia utilizado). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. De las colonias resultantes se seleccionaron 4 de cada transformación y se re-estriaron en placas de LB conteniendo kanamicina o cloranfenicol (según corresponda) y en placas de LB conteniendo ampicilina (estas últimas se incubaron a 30°C).

Las colonias seleccionadas fueron aquellas que crecieron en presencia de cloranfenicol o kanamicina según correspondía, lo cual era indicativo de la presencia del cassette de resistencia y que a su vez no crecieron en LB + ampicilina ya que esto indica que perdieron el plásmido pKD46 (que una vez realizada la recombinación ya no interesa mantenerlo).

### **2.3.3- Verificación de la sustitución de los genes a anular por el cassette de resistencia.**

Los mutantes resultantes se analizaron por medio de 3 PCRs para verificar que la inserción del cassette de resistencia al antibiótico se realizó en el sitio correcto. Las 2 primeras PCRs se realizaron cada una con un par de cebadores que consisten en un cebador común que hibrida dentro del cassette de resistencia al antibiótico y otro cebador diseñado para que hibride con los genes adyacentes al gen a anular (1,2 y 3,4 respectivamente) (Figura 4). De esta manera si el cassette se encuentra insertado en el lugar correcto se obtiene un amplicón de un tamaño determinado y en el caso de la cepa salvaje no habrá amplificación. Una tercer PCR se realiza con los cebadores (1 y 4), obteniéndose amplicones de tamaño diferente si el cassette de resistencia a antibiótico se incorporó en el lugar correcto o si se trata de la cepa salvaje.





**Figura 4.** Esquema de la ubicación de los cebadores utilizados para verificar la inserción del cassette de resistencia a antibiótico en el lugar correspondiente al gen que pretendemos anular.

### 2.3.4 -Transducción de las mutaciones en una nuevas cepas.

#### 2.3.4.1.- Preparación de lisados de fago P22 sobre los mutantes nulos SDU5 de los 4 genes seleccionados.

Luego se transfirieron estas mutaciones por transducción a las cepas 8/02 y SDU3, mediante el fago P22 que infecta *Salmonella*. De esta manera eliminamos posibles mutaciones no deseadas causadas por la Red recombinasa del fago  $\lambda$  en la primer cepa utilizada.

Con este fin se realizaron lisados de las cepas donadoras (los 4 mutantes: SDU5 *dps*::cm<sup>R</sup>, SDU5 *arcC*::cm<sup>R</sup>, SDU5 *yciF*::Km<sup>R</sup> y SDU5 *ygaU*::km<sup>R</sup> ). Para esto se utilizó un lisado de P22 sobre la cepa PT4 de *S. Enteritidis* el cual se diluyó seriadamente y 100  $\mu$ l de cada dilución de fago se mezcló con 200 $\mu$ l del cultivo incubado toda la noche (O/N) de la cepa donadora. Se dejó adsorber a 37°C durante 45 min. Se agregó la mezcla del fago y las bacterias a 3ml de top agar previamente fundido a 42°C y se volcó esta preparación sobre placas de LBA. Las placas se incubaron a 37°C hasta el otro día.

A continuación se levantó el top agar con rastrillo, de las placas en las que se veían calvas de lisis semi confluentes, agregando 1,5 ml de LB y 200 $\mu$ l de cloroformo. Se mezcló con vortex y se centrifugó a 2700 g, 30 min, 4°C y el sobrenadante se guardó a 4°C con 50 $\mu$ l de cloroformo.

#### 2.3.4.2 - Transducción de mutantes simples en los genes *dps*, *yciF*, *ygaU* y *arcC* hechos en SDU5 en *S. Enteritidis* 8/02 y *S. Dublin* SDU3.

Se mezclaron 100 $\mu$ l de un cultivo O/N de las cepas receptoras (8/02 y SDU3 salvajes) con 0, 10 y 100  $\mu$ l de lisados de P22 hechos sobre cepas donadoras (SDU5 con mutaciones individuales en los genes *dps*, *yciF*, *ygaU* y *arcC*).

Estas mezclas se incubaron a 37°C sin agitación durante 1 hora. Luego se le agregó 1 ml de LB + 10 mM de EGTA y se incubó otros 30 minutos a 37°C. Se centrifugó la mezcla a 3340 g por 10 minutos a temperatura ambiente y se sembró el pellet resuspendido en 100  $\mu$ l de LB, en LBA +

10 mM de EGTA, adicionado con el antibiótico correspondiente (cloranfenicol o kanamicina según de qué cepa donadora sea el lisado).

Las colonias aisladas que se obtuvieron se re-sembraron en medio de cultivo EBU agar y nuevamente en LBA + antibiótico + EGTA. Se utilizó el medio de cultivo EBU agar para discriminar colonias de *Salmonella* que estuvieran contaminadas con el fago P22 luego de realizar las transducciones. Las colonias contaminadas crecen en este medio de color azul oscuro y las no contaminadas se observan de color celeste claro.

El medio de cultivo EBU agar se prepara agregando a 400 ml de LBA 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g de D-glucosa, 0,5 ml de una solución 1% de Evans Blue, 1 ml de una solución 1% de Uranina.

Aquellas colonias que crecieron de color celeste claro en EBU y que a su vez crecieron en LBA+ antibiótico se seleccionaron como posibles mutantes nulos buscados.

#### **2.3.4.3.- Verificaciones de los mutantes.**

Se verificó que los genes que queríamos anular estuvieran sustituidos por el cassette de resistencia al antibiótico mediante las 3 PCRs que se describieron en el punto 5.3.3.

Además hicimos curvas de crecimiento de los mutantes en medio LB y las comparamos con las curvas de las respectivas cepas salvajes parentales crecidas en las mismas condiciones, para corroborar que las mutaciones no afectaran el crecimiento de las bacterias.

Se corroboró también que la movilidad en agar semisólido y la aglutinación en presencia de suero O9 (lo cual es indicativo de la integridad del LPS) de los mutantes, se mantuviera sin cambio con respecto a la cepa parental.

La construcción de los mutantes dobles se realizó con el mismo protocolo descrito anteriormente para los mutantes simples con la excepción de que la cepa receptora en la transformación en estos casos es un mutante simple.

### **2.4.- Análisis de los niveles de ARNm bacterianos.**

#### **2.4.1.-Extracción de ARN.**

Para extraer el ARN bacteriano se utilizó el kit RNeasy (Qiagen). Los cultivos O/N se diluyeron 1/100 en 10 ml de LB y se incubaron a 37°C, 200 rpm hasta una D.O 600 nm de aproximadamente 0,4-0,6. En el caso de cultivos crecidos en condiciones que imitan el intestino se diluyó el cultivo O/N en GMC y la incubación fue a 37°C sin agitación hasta fase exponencial (misma D.O<sub>600nm</sub> que la utilizada para preparar los extractos analizados por proteómica). Se mezclaron 250ul de cultivo con 500ul de RNA protect bacteria (Qiagen), se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para luego proseguir según las instrucciones del

fabricante.

Se cuantificó la cantidad de ARN obtenido, midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y se midió la relación 260/280 y 260/230 las cuales dan una idea de la contaminación de las muestras por proteínas u otras sustancias.

#### **2.4.2.- Tratamiento con DNAsa.**

0,5 µg de ARN extraído de cada muestra se procesaron con 0,6 U de DNAsa I (Invitrogen) para degradar el ADN contaminante. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se inactivó la enzima agregando 2,5mM de EDTA (concentración final) e incubando a 65°C durante 10 minutos.

#### **2.4.3.- Transcripción inversa.**

Posteriormente se procedió a sintetizar el ADN copia (ADNc) a partir de los ARNs obtenidos en el paso anterior, usando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Invitrogen). A 0,5 µg de ARN de cada cepa tratado con DNAsa se le agregaron 10µl de una mezcla conteniendo 1µl de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 4 µl de buffer de reacción 5x, 1µl de random primers (200 ng/µl), 1 µl RNase OUT, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl de M-MLV (200 U/µl) (Invitrogen).

La mezcla de reacción fue incubada por un ciclo de 10 minutos a 25°C, seguido de un ciclo de 50 minutos a 37°C y finalmente 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. El ADN copia generado se diluyó 1/16 en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se utilizó como molde en las reacciones de qPCR.

#### **2.4.4.- PCR cuantitativa en Tiempo Real (RTqPCR).**

Para cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm) se utilizaron cebadores diseñados con ayuda del algoritmo Primer-BLAST a partir de las secuencias disponibles en la base de datos GenBank. Se utilizó como gen normalizador a *icdA*, que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa (Cummings *et al.*, 2006), el cual previamente se verificó que no varía sus niveles de mensajero entre las distintas cepas analizadas o las distintas condiciones empleadas. Asimismo, se verificó que la eficiencia de las PCRs para los distintos genes en estudio así como para el gen normalizador, fueran cercanas al 100% y similares entre sí (datos no mostrados), requisito esencial para poder aplicar el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

La PCR en tiempo real se llevó a cabo empleando el *kit* comercial QuantiTech SYBR Green PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un

volumen final de 10µl conteniendo 5µl de QuantiTech SYBR Green mix, 0,3µM de ambos cebadores y 2µl de una dilución 1/16 del ADNc. Las reacciones de PCR se realizaron en el Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) y en la plataforma ABI 7900 HT (Applied Biosystems). Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 95°C durante 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. Al finalizar la reacción se realizó una curva de disociación incrementando 1°C cada 5 segundos hasta alcanzar una temperatura de 95°C. Luego se llevó a cabo la cuantificación relativa de los ARNm presentes en cada muestra siguiendo el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Brevemente, se obtuvo el valor de CT para el gen normalizador y para los genes problema; se determinó el  $\Delta CT$  para cada cepa (CT Gen problema - CT *icdA*) y finalmente se calculó el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (fold change, o niveles relativos de ARNm para un gen problema determinado, normalizados por los niveles del gen normalizador, y en una condición problema respecto a la condición de referencia o calibradora). Se consideró como condición calibradora una cepa elegida arbitrariamente, o la condición crecimiento en LB, respecto a GMC. En algunos casos se expresan los valores en forma del  $2^{-\Delta CT}$ , lo que indica niveles relativos de ARNm para un gen problema determinado, normalizados por los niveles del gen normalizador.

## **2.5.- Ensayos para probar fenotipo de mutantes.**

### **2.5.1.- Supervivencia a estrés oxidativo.**

La evaluación de la resistencia de *Salmonella* a estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno se llevó a cabo según el protocolo descrito por (Halsey *et al.*, 2004). Brevemente se cultivaron los mutantes y las respectivas cepas parentales 14-16 hs en caldo LB. Luego estos cultivos se diluyeron a una concentración de  $10^6$  UFC/ml en PBS estéril y se incubaron a 37°C con una concentración final de 0,5 mM de peróxido de hidrógeno. Se removieron alícuotas a 0,5, 1 y 2 hs de incubación y el número de células viables fue determinado por dilución serial y siembra en LB agar. El porcentaje de supervivencia fue calculado para cada cepa, como el porcentaje de unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en la incubación en PBS con peróxido de hidrógeno con respecto al número de UFC obtenidas en la incubación en PBS sin peróxido de hidrógeno.

### **2.5.2.- Respuesta a estrés osmótico.**

Se estudió el efecto de someter a los mutantes nulos en el gen *ygaU* y a las correspondientes cepas salvajes parentales a estrés osmótico mediado por KCl, según el protocolo descrito por (Ashraf *et al.*, 2016). Las cepas se crecieron O/N en medio LB, a 37°C y 200 rpm y a la mañana siguiente se realizó una dilución 1/100 del cultivo en un medio definido NaM9 con el agregado de 5 y 50 mM de KCl y se incubó a 37°C 200 rpm. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se

midió la  $DO_{600nm}$ . La composición del medio NaM9 es 3,4 g/l  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , 6,8 g/l  $NaH_2PO_4$ , 0,5 g/l NaCl, and 1,0 g/l  $NH_4Cl$ . 50ml de NaM9 se suplementó con 0,1 ml de  $MgSO_4$  1M, 0,005 ml de  $CaCl_2$  1M, 2% de glucosa (Ashraf *et al.*, 2016). Se compararon las curvas de crecimiento de los mutantes con respecto a su cepa salvaje parental en cada una de las concentraciones de KCl utilizadas.

## **2.6.- Evaluación de mutantes *in vitro*.**

### **2.6.1.- Ensayos de internalización y supervivencia en macrófagos.**

Para los ensayos de internalización y supervivencia en macrófagos se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB67™). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM high glucose; Sigma), conteniendo 10% de suero fetal bovino no inactivado, y solución antibiótico/antimicótico (50U/ml-50µg/ml Penicilina-estreptomicina) a 37°C en una atmósfera de 5% de  $CO_2$ . Un día antes del ensayo las células se sembraron en placas de 24 pocillos con  $2 \times 10^5$  células por pocillo aproximadamente. Para los cultivos bacterianos se inoculó una colonia en 3 ml de LB y se creció toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente los cultivos bacterianos se diluyeron 1/20 en el mismo medio termostatzado y se dejaron crecer a 37°C, 200 rpm durante 3 hs (hasta una  $D.O_{600nm} \sim 1-1.5$ ). Luego se añadieron 6 µl de cada cultivo a 2,5 ml de medio de células termostatzado y se añadió de esa suspensión 0,5 ml/pocillo en la placa de 24 pocillos con las células a infectar (previamente lavadas con 1 ml de PBS Dubelcco's termostatzado para eliminar el antibiótico del medio), para obtener una MOI aproximada de 10. Se centrifugaron las placas 5 min a 200 g, a temperatura ambiente (para sincronizar el contacto bacteria-célula para todas las cepas utilizadas).

Las placas se incubaron 30 minutos a 37°C para que las bacterias fueran fagocitadas. A continuación se descartó el medio, se lavó 2 veces con 1ml de PBS Dubelcco's precalentado y se añadió 1ml de medio con gentamicina (100 ug/ml) por pocillo (las cepas bacterianas utilizadas son sensibles a este antibiótico). Se incubó 1,5 hs a 37 °C para eliminar las bacterias extracelulares, manteniéndose vivas las que fueron internalizadas dado que el antibiótico no accede al interior celular. Una vez cumplido el tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS precalentado y para los pocillos que se iba a evaluar internalización se añadieron 0,5ml de Tritón X-100 al 0.1% preparado en agua MilliQ. Las placas se incubaron 15 min a 37°C, para facilitar la lisis celular. Posteriormente se añadieron 0,5ml de PBS para neutralizar parcialmente los efectos nocivos que causa el detergente en las bacterias y se tituló el número de UFC recuperadas por pocillo, mediante diluciones seriadas y se sembró en placas de LBA. Asimismo, se tituló el número de UFC en los inóculos.

En los pocillos destinados a evaluar la supervivencia intracelular, luego de 1,5hs de incubación con gentamicina 100 µg/ml, se lavó una vez con 1ml de PBS termostatzado y se añadió 1ml de medio con gentamicina 10 µg/ml precalentado. Las placas se incubaron a 37°C por 20,5hs horas (en total fueron 22 hs desde el primer agregado de medio con gentamicina), luego se lavaron 3 veces con PBS y se lisaron con Triton + PBS igual que se hizo para las muestras a 1,5hs post-infección. Se titularon las UFCs recuperadas por pocillo.

Se controló mediante siembra en LBA el sobrenadante de las células incubadas 1,5 hs con el medio con gentamicina 100 µg/ml, así como también luego de las 20,5 hs con gentamicina 10 µg/ml, para verificar ausencia de bacterias vivas.

Se analizaron las cepas por triplicado y un control negativo de células sin infectar.

## **2.7.- Evaluación de mutantes *in vivo*.**

Los protocolos de los ensayos en el modelo murino fueron aprobados por la comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Se utilizaron ratones Balb/C, hembras, comprados a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, Uruguay) y mantenidos en el bioterio del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, como fue descrito previamente.

El modelo de infección murino utilizado en este trabajo, se utiliza como modelo de infecciones invasivas por *Salmonella* en humanos, ya que en ratones susceptibles, serotipos de *Salmonella* no tifoideas como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* generan en los ratones una infección más similar a la fiebre tifoidea en humanos que a una gastroenteritis. Se empleó el modelo de infección competitiva, en el cual mutante y salvaje se inoculan simultáneamente en una proporción 1:1.

La noche anterior a la inoculación de los ratones, se puso a crecer el cultivo de bacterias (una colonia en 3 ml de LB), a 37°C 200 rpm de 14 a 16 hs. Al día siguiente se diluyó el cultivo 1/20 en 10 ml de LB precalentado y se incubó a 37°C, 200 rpm hasta que se alcanzó una  $DO_{600nm} \sim 1.2-1.3$ . Luego se diluyeron 50 µl del cultivo en 5ml de PBS 1X estéril. Se mezclaron en una proporción 1:1 el cultivo de cepa mutante y de cepa salvaje y se inocularon 200 µl de esa mezcla por ratón, con sonda intragástrica. Los inóculos se cuantificaron mediante siembra en medio con y sin antibiótico para obtener los números exactos de las UFC inoculadas de cada cepa.

Se inocularon oralmente grupos de ratones Balb/C hembras de 6 a 8 semanas con  $2-5 \times 10^6$  UFCs/ animal (relación 1:1 de wt y mutantes). Los animales se alojaron en cajas separadas, conectadas a un rack que les provee aire filtrado, recibiendo comida y agua *ad libitum*. 4 días post-infección los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se removió el bazo en

condiciones de esterilidad, se homogeneizó en PBS 1X estéril y se sembraron diluciones en medio rico LBA. Al día siguiente se resembraron 72 colonias aisladas (tocando con un palillo estéril la colonia y sembrando en LBA con antibiótico y sin antibiótico) para el cálculo del índice de competitividad (CI). Aquellas colonias que crecen en medio con el antibiótico son los mutantes en donde el gen anulado está sustituido por un cassette de resistencia a antibiótico y aquellas que no crecen en este medio pero sí en LBA son las cepas salvajes.

CI=  $\frac{\text{UFCs mutante}}{\text{UFCs wt ( en bazo)}}$

$\frac{\text{UFCs mutante}}{\text{UFCs wt (en inóculo)}}$

### **2.8.- Análisis estadísticos.**

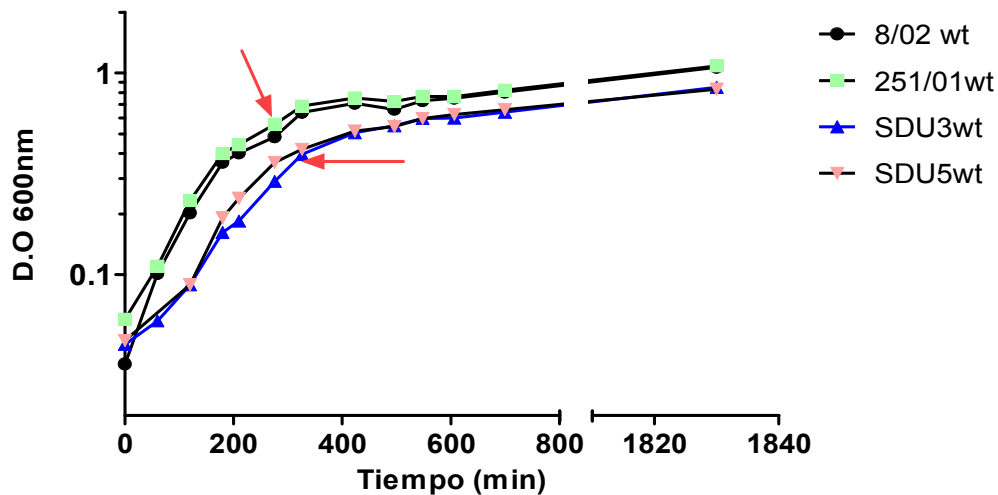
Para realizar el análisis estadístico de todos los ensayos se utilizó el software Graphpad Prism. En los ensayos en ratones en donde se calculó el CI, se utilizó el método one sample t test y en los ensayos de RTqPCR se utilizó el test Mann-Whitney, tomando en cuenta a  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## Capítulo 3.- Resultados.

### Resultados de proteómica comparativa.

#### 3.1.- Puesta a punto del crecimiento de *Salmonella* en medio de cultivo y condiciones que imitan el intestino de mamíferos (GMC).

Para entender cómo era el crecimiento en GMC, de las cepas de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* utilizadas en este trabajo realizamos curvas de crecimiento (Figura 5).



**Figura 5.** Curvas de crecimiento de *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) y *S. Dublin* (SDU3 y SDU5) crecidas en medio de cultivo que imita al intestino (GMC) a 37°C, sin agitación. A distintos intervalos de tiempo se midió la D.O a 600 nm. Las flechas rojas indican los puntos donde se recolectaron las muestras para realizar las extracciones de ARN y extractos proteicos.

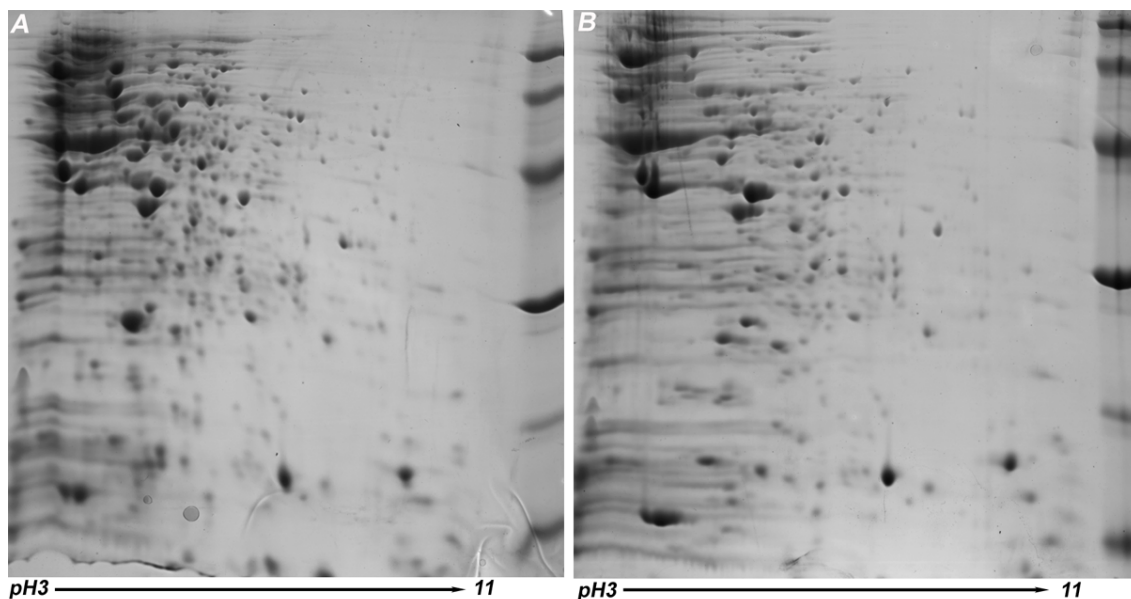
Como se observa, las cepas de *S. Dublin* crecen un poco más lento que las de *S. Enteritidis* y llegan a fase estacionaria a una  $D.O_{600nm}$  menor. En base a estos resultados elegimos recolectar *S. Dublin* y *S. Enteritidis* a las  $D.O_{600nm}$  0.35 y 0.55 aproximadamente respectivamente, para la posterior extracción de ARN y de extractos proteicos, de manera de estar en la misma fase de crecimiento (exponencial tardía).

#### 3.2.- Puesta a punto de la técnica de electroforesis bidimensional.

El primer resultado importante fue la puesta a punto de la técnica de separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional. Se probó en un principio un rango amplio de pH para la primera dimensión (pH 3-11 NL), cargando 60  $\mu$ g de proteínas totales en Immobiline™ DryStrips (GE Healthcare). Se observó que la gran mayoría de los spots se encontraban en el rango de



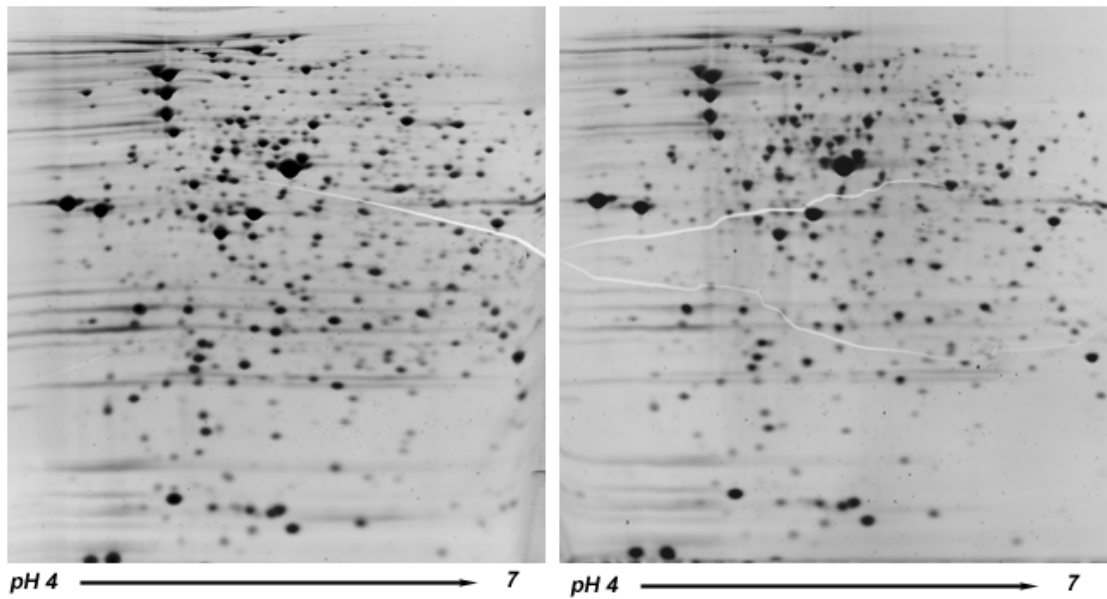
pH 4-7 por lo tanto se decidió que este era el rango óptimo para analizar los extractos proteicos con más detalle (Figura 6).



**Figura 6.** Análisis por electroforesis bidimensional de proteínas de los proteomas completos de las cepas SDu5 (A) y SE8/02 (B), usando para la primera dimensión Immobiline™ Dry Strips de 7cm de longitud y rango de pH de 3-11 NL. Se cargaron 60 µg de proteínas por gel y la tinción se realizó con Coomassie coloidal.

Se evaluó la utilización de distintos métodos de tinción de los geles de la segunda dimensión incluyendo nitrato de plata, coomassie coloidal y SYPRO® Ruby. En la tinción con plata se observó una mayor sensibilidad en comparación con la tinción con coomassie coloidal y la tinción con SYPRO® Ruby ofreció una sensibilidad similar a la tinción con plata (datos no mostrados). Finalmente elegimos teñir con SYPRO® Ruby debido a que a diferencia de la tinción con plata, tiene un mayor rango dinámico lineal y proporciona una mejor reproducibilidad para el análisis cuantitativo (Lopez *et al.*, 2000).

Se comprobó que la reproducibilidad de la técnica de electroforesis bidimensional es buena, cargando 2 geles con el mismo extracto proteico y exactamente la misma cantidad en µg de proteínas (50 µg de extracto de proteínas totales de SDU5 en cada gel) (Figura 7).

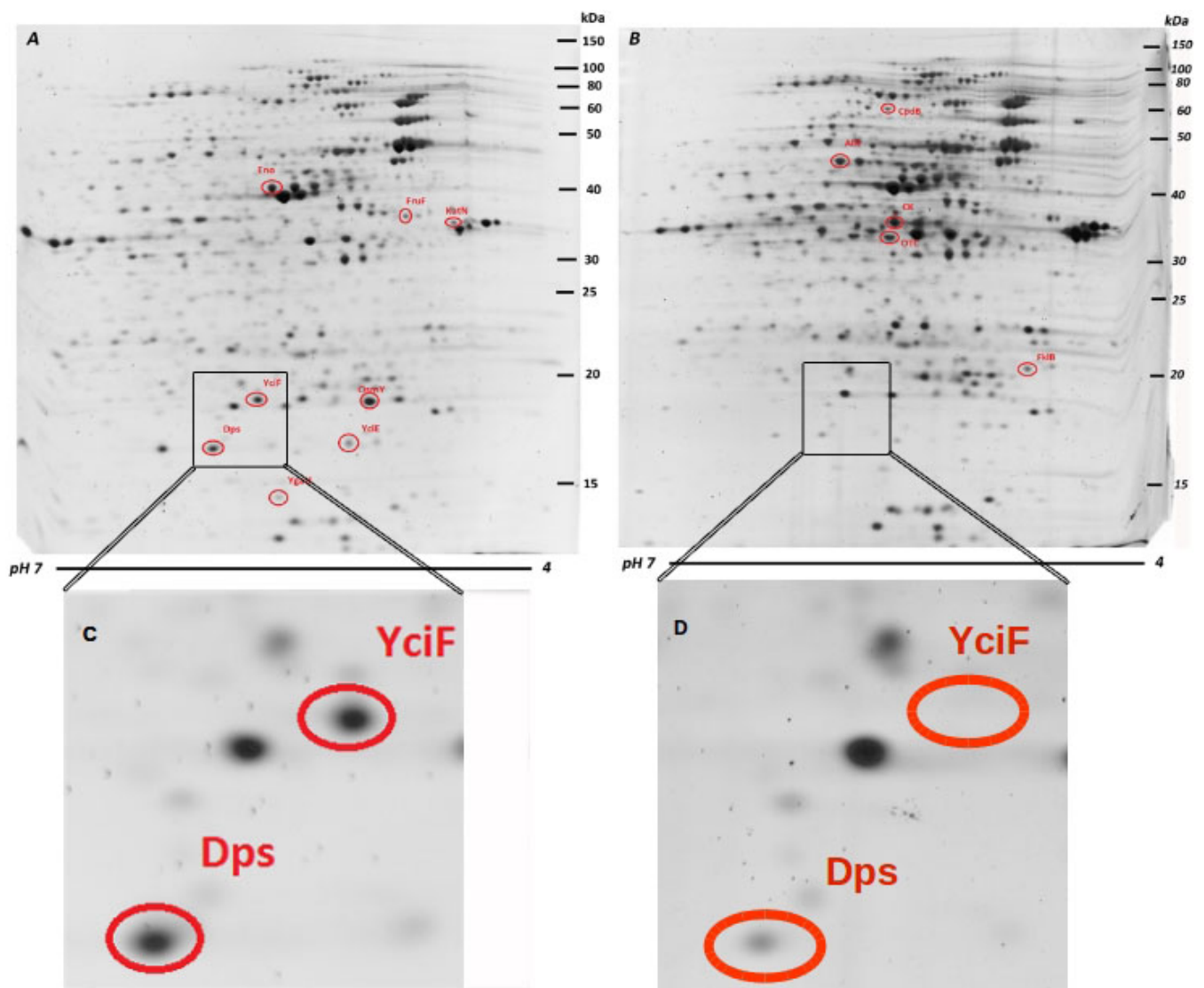


**Figura 7.** Electroforesis bi-dimensional de extracto proteico de aislamiento de *Salmonella* Dublin SDU5, por duplicado cargando 50 µg de proteínas en cada gel. Primera dimensión pH 4-7 y segunda dimensión gel de poliacrilamida 12.5%. Tinción con SYPRO® Ruby.

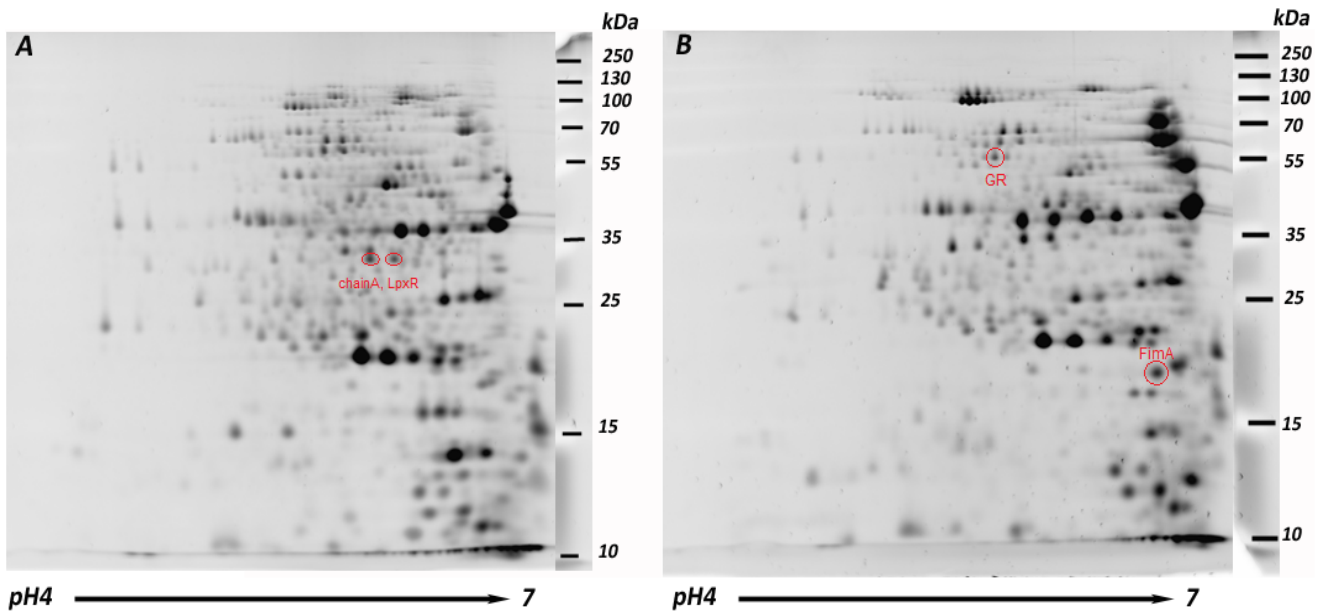
Luego de elegir los spots que queríamos recortar manualmente (diferencialmente representados entre serotipos), para su posterior análisis por EM, teñimos los geles con tinción de plata de modo de poderlos ver a simple vista.

### **3.3.- Proteómica comparativa entre *S. Dublin* y *S. Enteritidis* en condiciones GMC.**

Se seleccionaron 2 aislamientos de *Salmonella enterica* de cada serotipo y de distintos orígenes (*S. Enteritidis* 8/02 y 251/01 y *S. Dublin* SDU3 y SDU5). Los aislamientos se cultivaron *in vitro* en un medio de cultivo que imita las condiciones intestinales de mamíferos, ya que está bien aceptado que es en el intestino del hospedador donde se define la evolución que va a tener la enfermedad. Se analizaron comparativamente los proteomas totales y de superficie de las cepas seleccionadas en geles bidimensionales de proteínas, en 2 experimentos independientes. En total se analizaron 4 geles de cada serotipo, tanto para extractos de proteínas totales como de superficie. Los geles de ambas cepas de cada serotipo eran muy similares entre sí (Anexo figuras S1 Y S2)). En la figuras 8 y 9 se muestran un gel representativo de los proteomas totales y de superficie respectivamente, de una cepa de cada serotipo y se señalan los spots diferencialmente representados en todos los geles de un serotipo con respecto a todos los geles del otro, en los cuales identificamos las proteínas por medio de EM.



**Figura 8.** Fotografía de un gel bi-dimensional representativo de cada uno de los serotipos para extractos de proteínas totales teñidos con SYPRO® Ruby. Panel A: *S. Dublin* (SDU3), B: *S. Enteritidis* (8/02). Los spots señalados se corresponden con las proteínas diferencialmente representadas que fueron identificadas por espectrometría de masas. En el panel C se muestra una ampliación de la zona donde se encuentran los spots correspondientes a las proteínas YciF y Dps en *S. Dublin* y en el panel D se muestra la misma zona en *S. Enteritidis*.



**Figura 9.** Fotografía de un gel bi-dimensional representativo de cada uno de los serotipos para extractos de proteínas de superficie teñidos con SYPRO® Ruby. Los spots señalados se corresponden con las proteínas sobre-representadas en uno de los serotipos que fueron identificadas por espectrometría de masas. Panel A: *S. Dublin* (SDU3) y B: *S. Enteritidis* (251/01).

A partir de los gels de proteínas de extractos totales y de superficie lograron identificar 9 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* y 7 proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis*. La identidad de estas proteínas se muestra en las tablas 6 y 7.

Seis de las 9 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* (Tabla 6), cumplen funciones relacionadas a la protección frente a estrés o se sobre-expresan en estas condiciones.

**Tabla-6.** Lista de Proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis*.

Proteínas sobre-representadas en <i>S. Dublin</i>				
Proteína	Función/Descripción	PM (kDa)	Referencias	Tipo de extracto proteico
Dps*	Protección del ADN frente a estrés oxidativo, térmico, ácido, nucleasas, etc.	16.5	(Almiron et al., 1992, Nair et al., 2004, Minsky et al., 1999, Zhao et al., 2002, Wolf et al., 1999)	proteínas totales
YciF*	El gen ortólogo que la codifica en <i>E. coli</i> se sobre-expresa en estrés osmótico. En <i>S. Typhimurium</i> se sobre-expresa en presencia de bilis.	18.9	(Prouty et al., 2004, Weber et al., 2006).	
YciE*	Idem YciF.	16.7	(Prouty et al., 2004, Weber et al., 2006).	
KatN*	Catalasa, función de protección frente a estrés oxidativo.	35	(Hebrard et al., 2009)	
FruF	Subunidad IIA/ HPr del sistema de transporte de fructosa PTS. Fosforilación y transporte de fructosa a través de membrana celular.	36.3	(Geerse, Izzo and Postma, 1989)	
YgaU*	Ortóloga en <i>E. coli</i> participa en remodelación del peptidoglicano en condiciones de estrés en la envoltura y como un sensor citosólico de potasio. Su gen en <i>E. coli</i> se sobre-expresa en respuesta a condiciones de estrés osmótico.	14.2	(Bernal-Cabas et al., 2015, Ashraf et al., 2016).	
Eno	Enolasa. Implicada en metabolismo de glucosa. Se expresa también en superficie y puede unirse al plasminógeno humano.	40	(Chauhan et al., 2012, Shan et al., 2009, Pancholi et al., 2003)	superficie y totales
OsmY*	Proteína inducible por estrés hiperosmótico en <i>E. coli</i> . En <i>S. Typhi</i> se induce en condiciones de inducción de SPI-2 (medio con baja concentración de fosfato y magnesio, pH 5.8)	18.7	(Zheng et al., 2015, Yim y Villarejo, 1992, Yim et al., 1994)	
LpxR	Modificación del LPS en <i>S. Typhimurium</i>	32	(Kawano et al., 2010, Kawasaki et al., 2012)	

\* Indica aquellas proteínas reguladas por el factor sigma alternativo RpoS (Ibanez-Ruiz et al., 2000, Robbe-Saule et al., 2001, Yim et al., 1994, Zheng et al., 2015). PM: Peso molecular experimental

**Tabla-7.** Lista de Proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis* con respecto a *S. Dublin*.

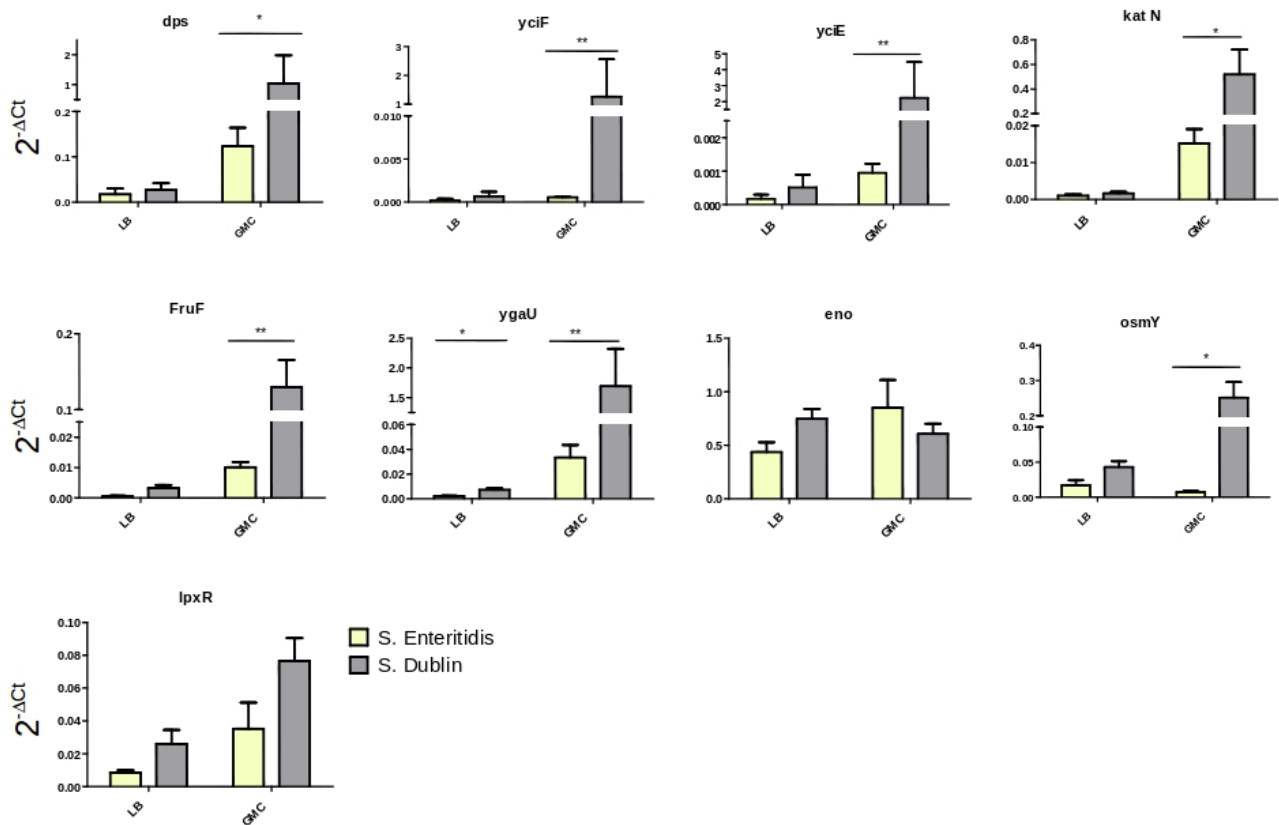
Proteínas sobre-representadas en <i>S. Enteritidis</i>				
Proteína	Función/Descripción	PM	Referencias	Tipo de extracto proteico
FKIB	Proteína del tipo peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa, que participan en el plegamiento de proteínas	20.46	(Fanghanel and Fischer, 2004)	Proteínas totales
CpdB	Enzima bifuncional (2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterasa/3'-nucleotidasa). Degradación de ácidos ribonucleicos	60	(Liu et al., 2015)	
ADI	Arginina deiminasa. Degradación de arginina	45.4	(Cunin et al., 1986)	
OTC	ornitina carbamoiltransferasa. Degradación de arginina	33.7	(Cunin et al., 1986)	
CK	Carbamato-kinasa. Degradación de arginina	35.7	(Cunin et al., 1986)	
Fim A	Subunidad mayor de fimbria	19.2	(Saini et al., 2009, Zeiner et al., 2012)	Proteínas de superficie
Gor	Glutation-reductasa. Reduce GSSG(glutati6n disulfuro) para formar GSH (glutati6n en su forma sulfhidrilo), el cual est6 involucrado en la resistencia a especies reactivas del ox6geno y nitr6geno en <i>Salmonella</i>	54	(Song et al., 2013)	

PM: Peso molecular experimental

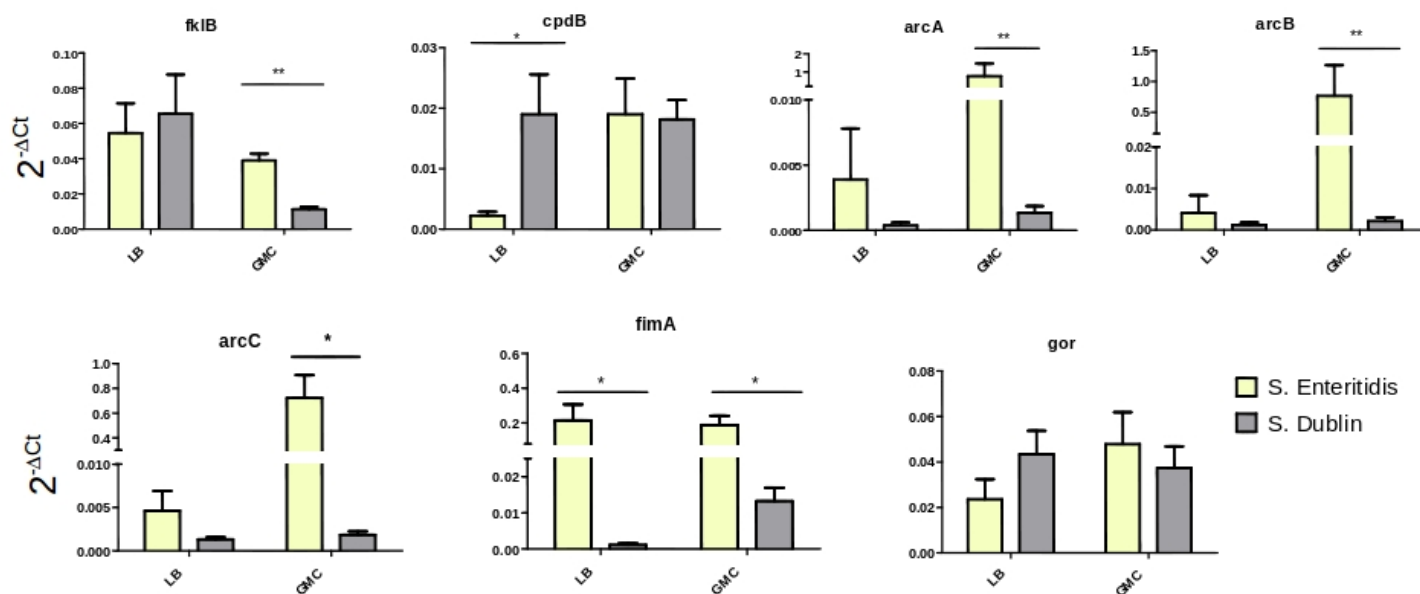
### 3.4.- Expresi6n de genes que codifican para las prote6nas identificadas por EM en la aproximaci6n prote6mica, en GMC y en medio rico LB.

Para complementar los resultados de prote6mica se estudiaron los niveles de ARNm de los genes que codifican para las prote6nas identificadas por EM. Cuando las bacterias fueron crecidas en condiciones que imitan las intestinales de mam6feros, 7 de los 9 genes que codifican para prote6nas sobre-representadas en Dublin tambi6n presentaron niveles de ARNm significativamente superiores a los encontrados en Enteritidis (Figura 10). Del mismo modo, 5 de los 7 genes que codifican para prote6nas sobre-representadas en los proteomas de Enteritidis presentan niveles mayores de ARNm en este serotipo (Figura 11). Esto apoya lo observado en el an6lisis prote6mico. Las excepciones las constituyen los genes *lpxR* y *eno* para *S. Dublin*, as6 como *cpdB* y *gor* para *S. Enteritidis*. Para *lpxR* se encontraron niveles de ARNm mayores en *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis*, pero la diferencia no fue significativa. Por otro lado, para *eno*, *cpdB* y *gor* se encontraron niveles de ARNm similares en ambos serotipos cuando crecidos en GMC. Este resultado sugiere que para estos genes existir6an eventos de regulaci6n post-transcripci6n, que explicar6an los resultados obtenidos por prote6mica.

Por otro lado, cuando las bacterias fueron crecidas en medio rico LB y buena oxigenaci6n no se observaron diferencias en los niveles de ARNm entre serotipos para la mayor6a de los genes estudiados, excepto para *ygaU* (entre las prote6nas sobre-representadas en *S. Dublin*) y *cpdB* y *fimA* (entre las sobre-representadas en *S. Enteritidis*) (Figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Niveles de ARNm de genes que codifican para proteínas identificadas en la aproximación proteómica y sobre-representadas en *S. Dublin*, en aislamientos crecidos en medio rico (LB) y en condiciones que imitan el intestino (GMC). Barras amarillas: *S. Enteritidis*, barras grises: *S. Dublin*. \* p-valor < 0.01, \*\* p-valor < 0.001 (test Mann-Whitney). Se analizaron 4 aislamientos de *S. Dublin* (SDU1, SDU3, SDU5 y SDU6) y 4 de *S. Enteritidis* (SEN 31/88, SEN 8/89, SEN 251/01 y SEN 8/02). Las barras de error indican el error standard de la media.



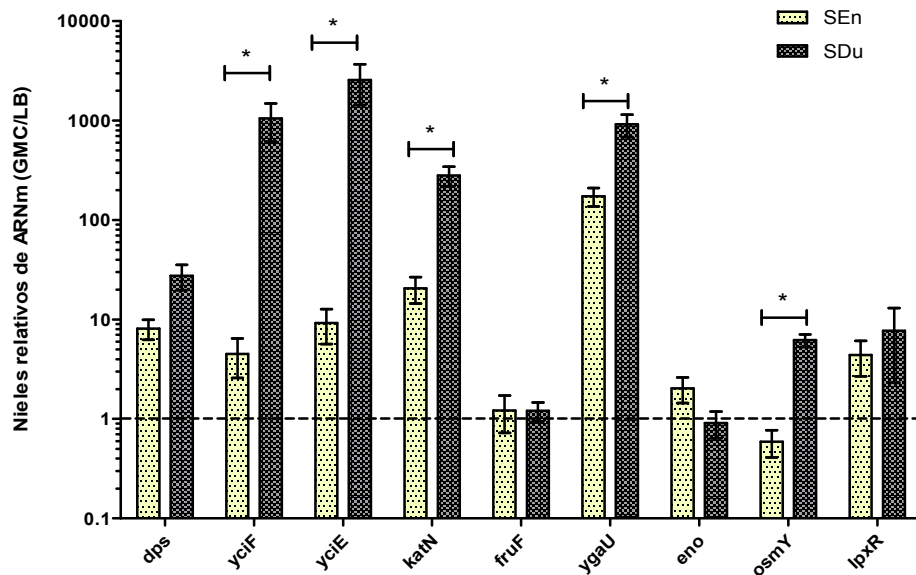
**Figura 11.** Niveles de ARNm de genes que codifican para proteínas identificadas en la aproximación proteómica y sobre-representadas en *S. Enteritidis*, en aislamientos crecidos en medio rico (LB) y en condiciones que imitan el intestino (GMC). Barras amarillas: *S. Enteritidis*, barras grises: *S. Dublin*. \* p-valor < 0.01, \*\* p-valor < 0.001 (test Mann-Whitney). Se analizaron 4 aislamientos de *S. Dublin* (SDU1, SDU3, SDU5 y SDU6) y 4 de *S. Enteritidis* (SEN 31/88, SEN 8/89, SEN 251/01 y SEN8/02). Los genes *arcABC* codifican para las proteínas ADI, OTC y CK respectivamente. Las barras de error indican el error standard de la media.



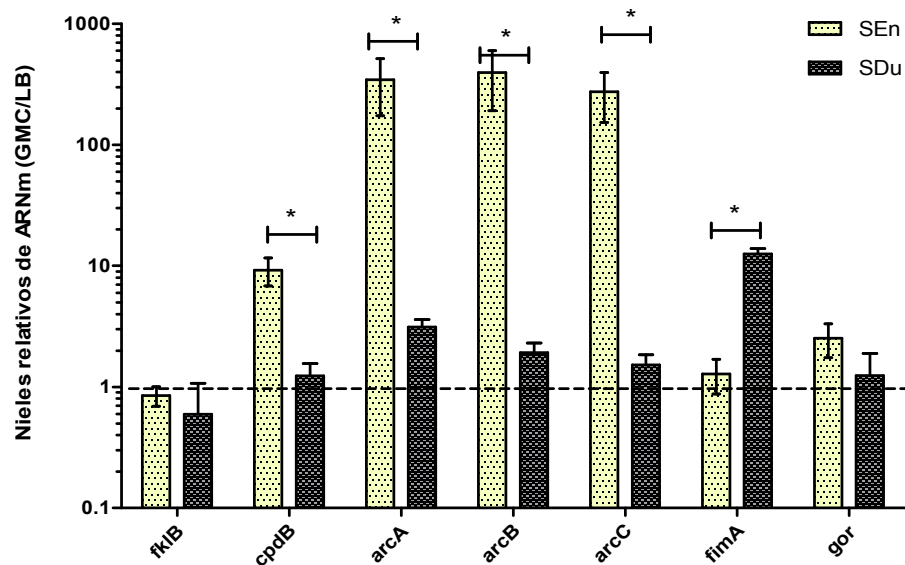
Otro dato interesante que se puede deducir de los resultados anteriores es que los dos serovares responden con distinta intensidad a las condiciones ambientales en que crecen. En la figura 12 se grafican los niveles relativos de ARNm para los genes codificantes de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin*, cuando las bacterias se crecen en las condiciones que imitan el intestino (baja oxigenación, alta presión osmótica y presencia de sales biliares) respecto a cuando se crecen en condiciones óptimas (medio rico LB, sin estrés osmótico y con buena oxigenación).

Como se puede apreciar en esta figura, hay un aumento en los niveles de ARNm para los genes *dps*, *yciF*, *yciE*, *katN*, *ygaU*, *osmY* y *lpxR*, cuando las bacterias se crecen en GMC respecto a cuando se crecen en condiciones óptimas, tanto en los aislamientos de *S. Dublin* como en los de *S. Enteritidis*. Esto es de esperar para el caso de *dps*, *yciF*, *yciE*, *katN*, *ygaU* y *osmY*, dado que estos genes son controlados por el factor sigma alternativo RpoS, el cual induce la expresión de genes implicados en la respuesta a diversas condiciones de estrés. Sin embargo, en los aislamientos de *S. Enteritidis*, este aumento es significativamente menor que el observado para *S. Dublin*. Este resultado sugiere que las cepas del serovar Dublin responden de manera más eficiente a las condiciones de estrés ambiental que las de *S. Enteritidis*.

En la figura 13 se observa la relación entre los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis*, en medio GMC con respecto a condiciones óptimas de crecimiento. Como se puede observar en la gráfica, para los genes *cpdB*, *arcA*, *arcB* y *arcC* en el serotipo Enteritidis los niveles de ARNm en GMC aumentan notablemente en relación a la condición óptima de crecimiento, y este aumento es significativamente mayor que el observado para los aislamientos del serovar Dublin. Curiosamente, para el gen *fimA*, se observa un aumento significativamente mayor en los niveles de ARNm en GMC respecto a LB en *S. Dublin* que en *S. Enteritidis*, lo cual está dado porque en condiciones óptimas de crecimiento la expresión de este gen es muy baja en el serovar Dublin (ver figura 11).



**Figura 12.** Niveles relativos de ARNm de genes que codifican para proteínas sobre-representadas en *S. Dublin*, en medio GMC relativo a condiciones óptimas de crecimiento. Se indica con línea punteada el valor de 1, equivalente a igual nivel de ARNm en ambas condiciones de cultivo. Se muestran resultados para 4 aislamientos de *S. Dublin* (SDU1, SDU3, SDU5 y SDU6) y 4 de *S. Enteritidis* (SEN 31/88, SEN 8/89, SEN 251/01 y SEN 8/02). \* P-valor <0.01 \* (test Mann-Whitney). Las barras de error indican el error estándar de la media.

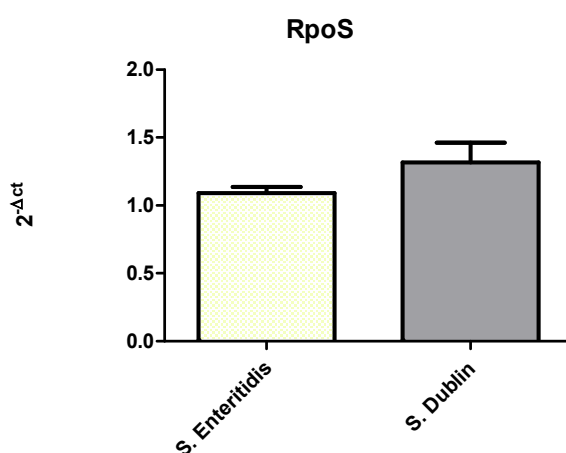


**Figura 13.** Niveles relativos de ARNm de genes que codifican para proteínas sobre-representados en *S. Enteritidis*, en medio GMC relativo a condiciones óptimas de crecimiento. Se indica con línea punteada el valor de 1, equivalente a igual nivel de ARNm en ambas condiciones de cultivo. Se muestran resultados para 4 aislamientos de *S. Dublin* (SDU1, SDU3, SDU5 y SDU6) y 4 de *S. Enteritidis* (SEN 31/88, SEN 8/89, SEN 251/01 y SEN 8/02). \* P-valor <0.01 \* (test Mann-Whitney). Las barras de error indican el error estándar de la media.

### 3.5.- Expresión del factor sigma alternativo RpoS.

Está reportado que varios de los genes que codifican para proteínas sobre-expresadas en *S. Dublin* son regulados por el factor sigma alternativo RpoS. Esta proteína es una subunidad de la ARN polimerasa y es el regulador maestro de la respuesta general a estrés de muchas bacterias gram negativas. Los genes dependientes de este factor sigma confieren resistencia a múltiples condiciones de estrés: oxidativo, térmico, osmótico, ácido, radiación UV, etanol, entre otras (Hengge-Aronis, 2002). Además afecta directa o indirectamente la abundancia de proteínas involucradas en una variedad de procesos incluidos metabolismo, tráfico de membrana, factores de virulencia y de varias proteínas no caracterizadas (Lago *et al.*, 2017). Una de las formas de regulación del factor  $\sigma^S$  es a nivel transcripcional, dado que está reportado que la transcripción de *rpoS* se induce cuando la velocidad de crecimiento comienza a disminuir (entrada en fase estacionaria) (Hengge-Aronis, 2002).

Nos interesó evaluar los niveles de ARNm del gen *rpoS* en *S. Enteritidis* y *S. Dublin* en las cepas crecidas en GMC, para dilucidar si su sobre-expresión podría estar relacionada con el aumento en la expresión de los genes bajo su regulación, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos serotipos (Figura 14).



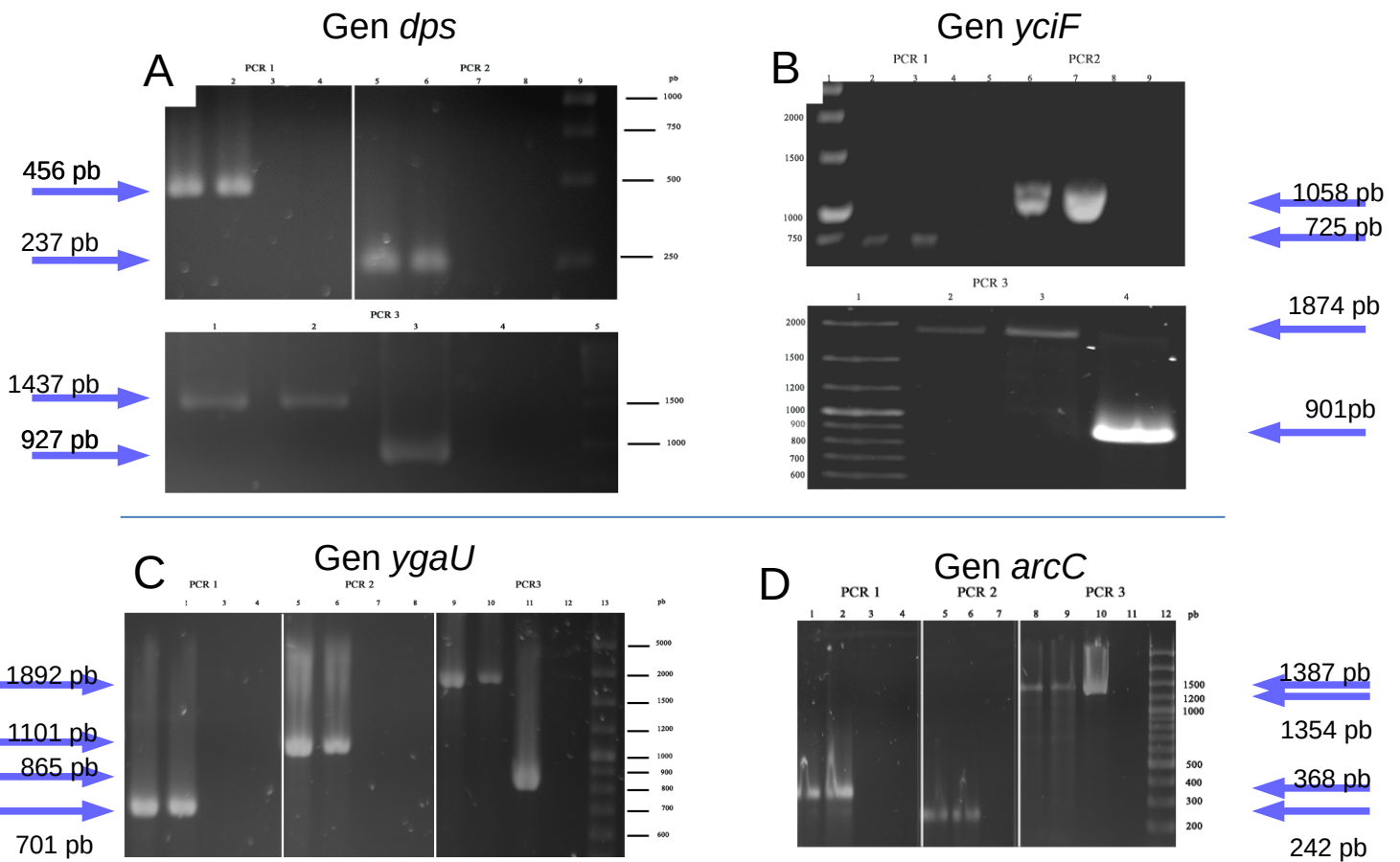
**Figura 14.** Niveles de ARNm para RpoS, en aislamientos crecidos condiciones que imitan el intestino (GMC). Barra amarillas: *S. Enteritidis*, barra gris: *S. Dublin*. Se analizaron 4 aislamientos de *S. Dublin* (SDU1, SDU3, SDU5 y SDU6) y 4 de *S. Enteritidis* (31/88, 8/89, 251/01 y 8/02). Estadístico (test Mann-Whitney),  $p > 0.05$ . Las barras de error indican el error estándar de la media.

### 3.6.- Construcción de mutantes nulos y verificaciones.

A partir de los resultados de proteómica y qPCR seleccionamos 4 genes (*dps*, *yciF*, *ygaU* y *arcC*) que nos resultaron interesantes según la bibliografía consultada para anularlos en una cepa de cada serotipo mediante la técnica descrita por (Datsenko KA and Wanner BL, 2000). Brevemente esta técnica de inactivación de genes consiste en la amplificación de un cassette de resistencia a antibiótico flanqueado por las regiones adyacentes al gen que queremos anular. Luego se transforman las células receptoras competentes que previamente fueron transformadas con el plásmido pKD46 (que porta a la recombinasa del fago lambda) con estos amplicones. Por recombinación homóloga se sustituye en gen que deseamos anular por el cassette de resistencia a antibiótico y las colonias transformantes se seleccionan en medio de cultivo con el antibiótico correspondiente.

Se construyeron mutantes nulos simples en los genes *dps*, *yciF*, *ygaU* y *arcC* en una cepa de *S. Enteritidis* (8/02) y una de *S. Dublin* (SDU3). Para estudiar si había redundancia en las funciones de los genes *dps*, *yciF* e *ygaU* construimos también mutantes dobles *dps::cm<sup>R</sup>/ygaU::km<sup>R</sup>* y *dps::cm<sup>R</sup>/yciF::km<sup>R</sup>*.

Para cada uno de los mutantes se verificó que el gen de interés estuviera sustituido por el cassette de resistencia a antibiótico, mediante la amplificación de 3 productos de PCR como se muestra en la figura 15. Los tamaños de estos amplicones fueron los esperados (Figura 15 y tabla 8).



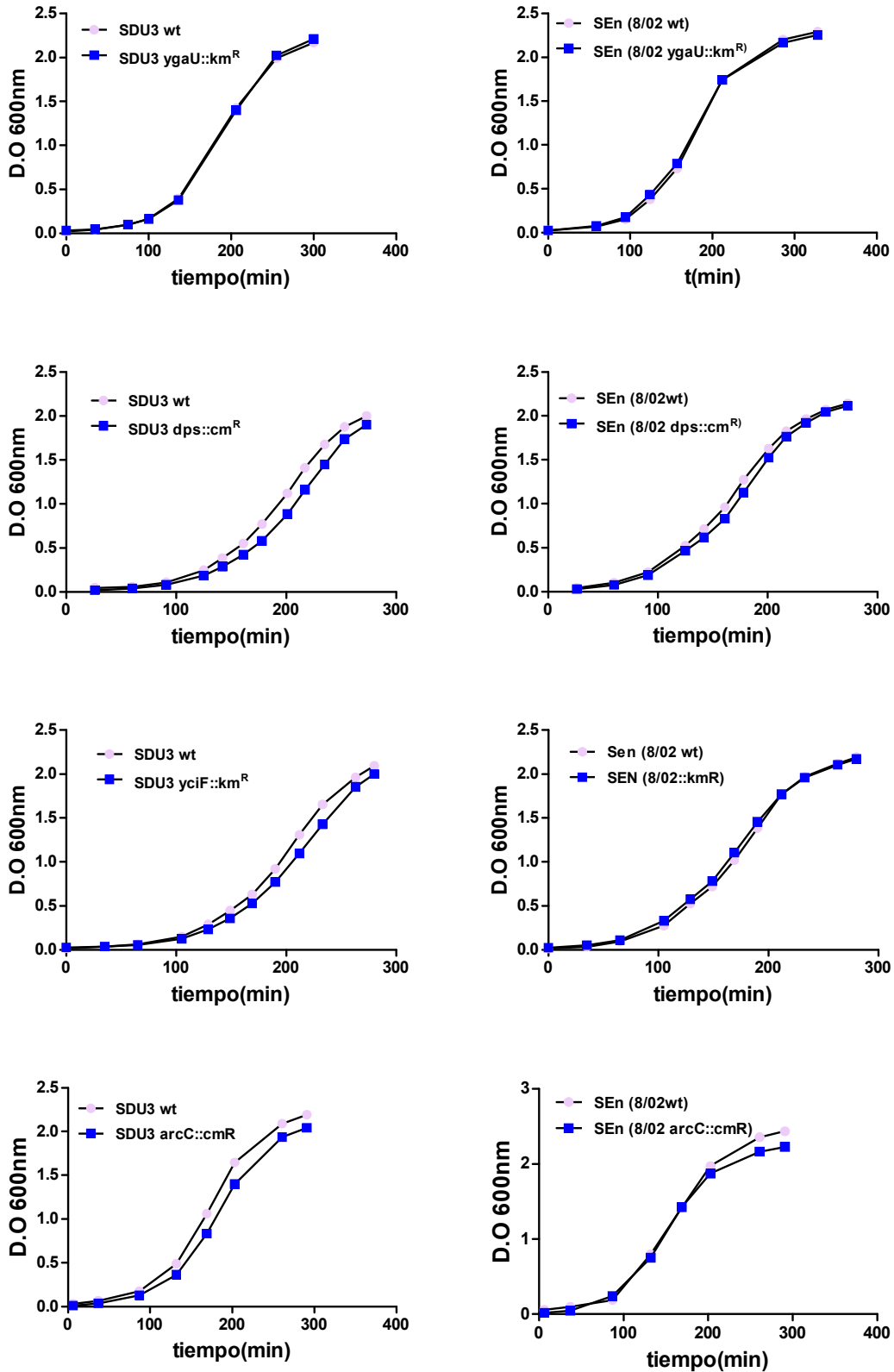
**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, de amplicones obtenidos en las 3 PCRs para verificar la inserción del gen de resistencia a kanamicina o cloranfenicol en el lugar de cada gen a anular. Ordenes de carga en cada panel: **A)** *dps*, gel de arriba: 1-4: SEEn 8/02 *dps::cm<sup>R</sup>*, SDU3 *dps::cm<sup>R</sup>*, SDU3 wt, control negativo sin ADN (C-) respectivamente, carriles 5-8 idem orden que anterior, carril 9: MPM, gel de abajo: carriles 1-4 idem orden que anterior, 5: MPM. **B)** *yciF*, gel de arriba: 1: MPM, 2-5: SEEn 8/02 *yciF::cm<sup>R</sup>*, SDU3 *yciF::cm<sup>R</sup>*, SDU3 wt, C- respectivamente, 6-9: idem orden que anterior, gel de abajo ídem orden que anterior. **C)** *ygaU*, 1-4: SEEn 8/02 *ygaU::cm<sup>R</sup>*, SDU3 *ygaU::cm<sup>R</sup>*, SDU3 wt, C- respectivamente, 5-8 idem orden que anterior, 9-12: idem orden que anterior, 13 MPM; **D)** *arcC* orden idéntico a panel C. En las PCRs 1 y 2 se obtiene un amplicón de un tamaño determinado si el cassette se encuentra insertado en el lugar correcto y en el caso contrario no habrá amplificación. En la tercer PCR se obtienen amplicones de tamaño diferente si el cassette de resistencia a antibiótico se incorporó en el lugar correcto o no. MPM 100pb Plus, Fermentas.

**Tabla 8.** Tamaños de los amplicones (en pb) de las 3 PCRs para verificar la inserción del cassette de resistencia de antibiótico en lugar de los genes a anular.

<b>CEPA</b>	<b>PCR 1</b> (primers para verificar cada mutante F y C1 o K1 según el cassette de resistencia a antibiótico utilizado)	<b>PCR 2</b> (primers para verificar cada mutante R y C2 o K2 según el cassette de resistencia a antibiótico utilizado)	<b>PCR 3</b> (Primers para verificar cada mutante F y R)
<i>dps::cm<sup>R</sup></i>	456	237	1437
cepa salvaje	-	-	927
<i>yciF::Km<sup>R</sup></i>	725	1058	1874
cepa salvaje	-	-	901
<i>ygaU::km<sup>R</sup></i>	701	1101	1892
cepa salvaje	-	-	865
<i>arcC::cm<sup>R</sup></i>	368	242	1354
cepa salvaje	-	-	1387

Se constató que los mutantes no tenían afectadas las funciones básicas de crecimiento como la movilidad e integridad de LPS . En la figura 16 se muestran las curvas de crecimiento de los mutantes simples y las cepas salvajes, en las que se observa que la manipulación genética no afectó las propiedades de crecimiento en comparación con los aislamientos originales.

Los mutantes dobles fueron chequeados de la misma manera que los mutantes simples y todas las verificaciones fueron satisfactorias .



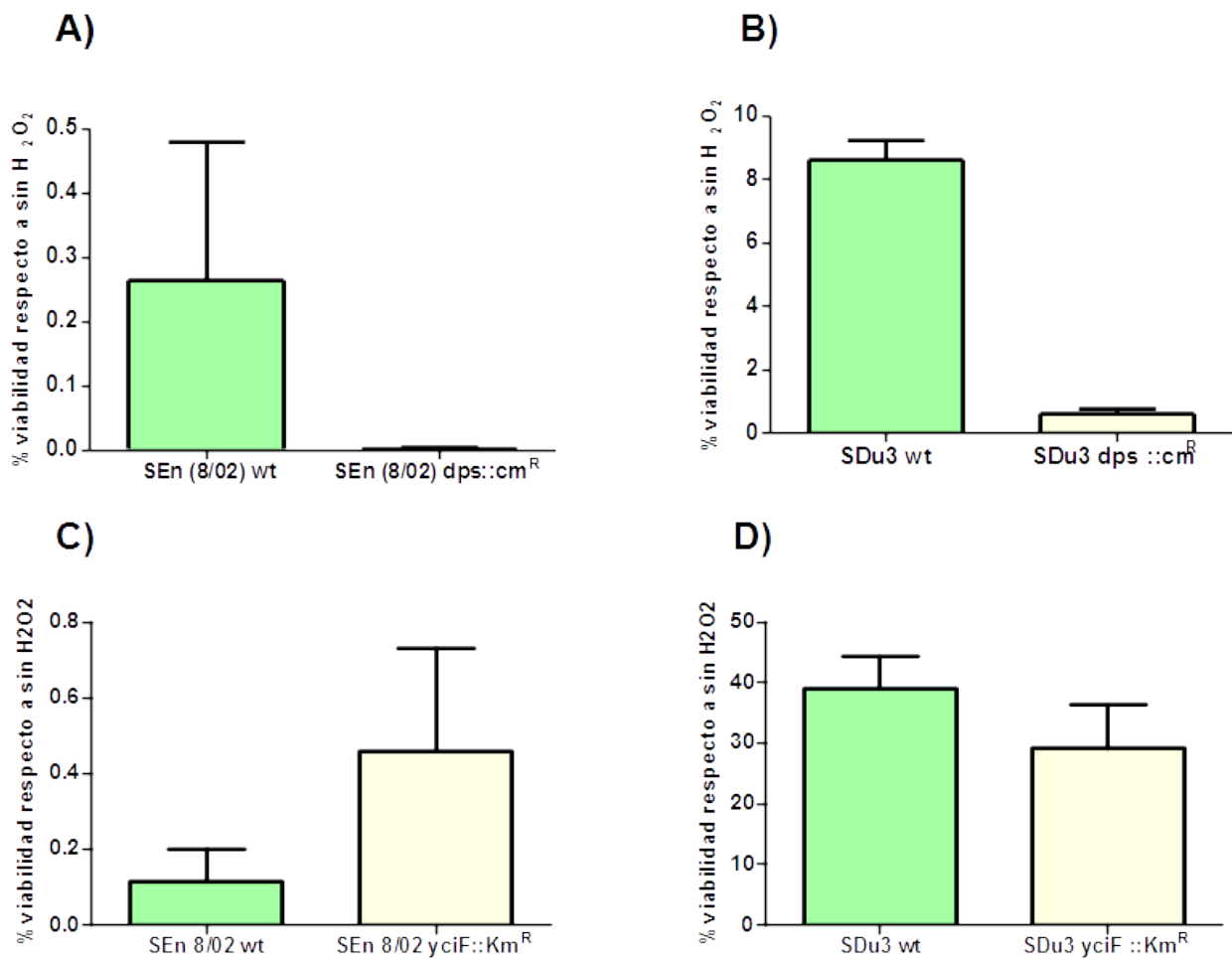
**Figura 16.** Curvas de crecimiento en medio LB de mutantes simples nulos en comparación con las cepas parentales correspondientes. Izquierda: mutantes en fondo *S. Enteritidis* 8/02 y derecha: mutantes en fondo *S. Dublin* SDU3.

### **3.7.- Fenotipo de mutantes**

#### **3.7.1.- Ensayos de resistencia a estrés oxidativo.**

Dado que se ha reportado un rol de la proteína Dps en la protección de *Salmonella* frente a estrés oxidativo (Halsey *et al.*, 2004; Nair and Finkel, 2004), analizamos comparativamente la capacidad de resistir a la presencia de peróxido de hidrógeno de los mutantes nulos en *dps* y las respectivas cepas parentales. También analizamos la resistencia a estrés oxidativo de los mutantes nulos en *yciF* ya que se conoce la estructura cristalina de YciF en *Escherichia coli* y tiene estructuras similares a un dominio catalasa en la proteína bll3758 de *Bradyrhizobium japonicum*, sugiriendo un rol en la protección de la célula al daño oxidativo (Hindupur *et al.*, 2006). Como se observa en la Figura 17, paneles A y B, la anulación del gen *dps* afecta la capacidad de supervivencia al estrés causado por peróxido de hidrógeno en los dos serotipos. Interesantemente ambos serovares tienen diferencias en la capacidad de sobrevivir al estrés oxidativo, *S. Dublin* sobrevive mejor a esta condición con respecto a *S. Enteritidis* (tanto el mutante como la cepa salvaje). Con respecto a *yciF*, su anulación parece no afectar la capacidad de supervivencia frente a este tipo de estrés (Figura 17, paneles C y D).

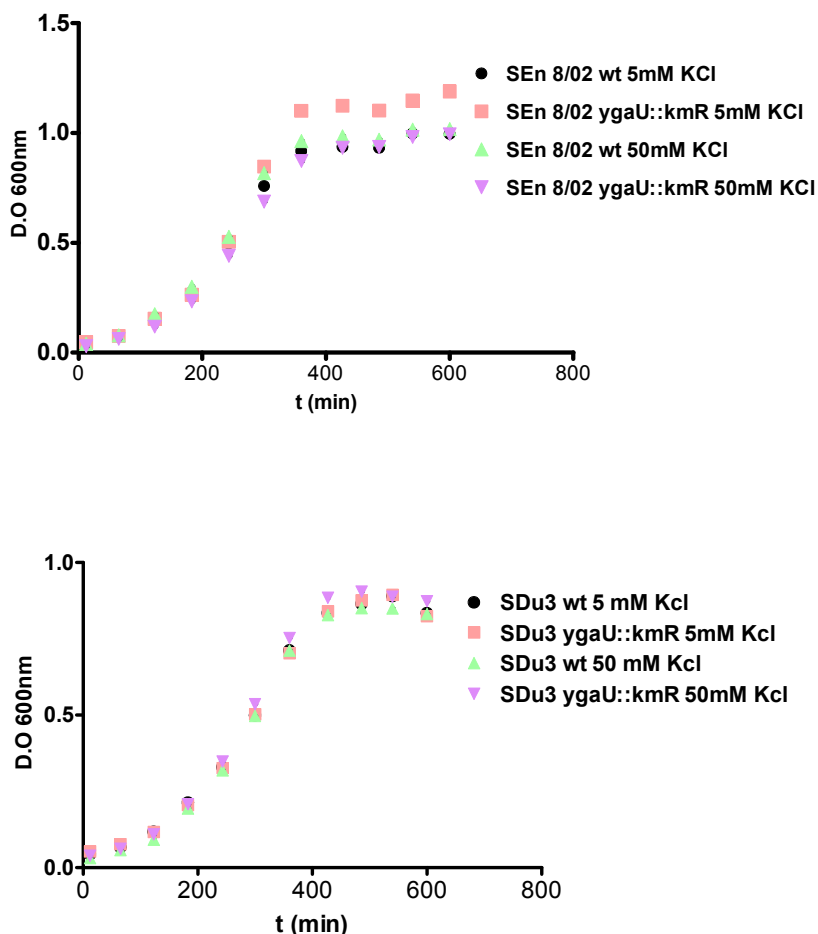




**Figura 17.** Porcentaje de supervivencia de mutantes y cepas salvajes parentales, luego de 2 hs de exposición a 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con respecto a la condición sin peróxido de Hidrógeno. Paneles A y B: mutantes nulos *dps* en *S. Enteritidis* y *S. Dublin* respectivamente. Paneles C y D: mutantes nulos *yciF* en *S. Enteritidis* y *S. Dublin* respectivamente. Se muestra el resultado promedio de 2 experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media.

### 3.7.2 Ensayos de resistencia a estrés osmótico (KCl)

Si bien no hay datos sobre la función de la proteína YgaU en *Salmonella*, se han propuesto dos funciones diferentes para la homóloga de *E. coli*: protección frente a estrés en la envoltura, aumentando el entrecruzamiento del peptidoglicano (Bernal-Cabas, Ayala and Raivio, 2015) y función de sensor citoplásmico de potasio, cuyo rol se requiere para el crecimiento normal de *E. coli* a elevadas concentraciones de  $K^+$  (Ashraf *et al.*, 2016). Por tanto estudiamos comparativamente las velocidades de crecimiento de los mutantes nulos en el gen *ygaU* comparando con las respectivas cepas parentales sometidos a estrés osmótico por agregado de KCl (Figura 18). A diferencia de lo observado para *E. coli*, no hay diferencia en la velocidad de crecimiento de los mutantes nulos con respecto a las cepas parentales a las concentraciones de KCl utilizadas.



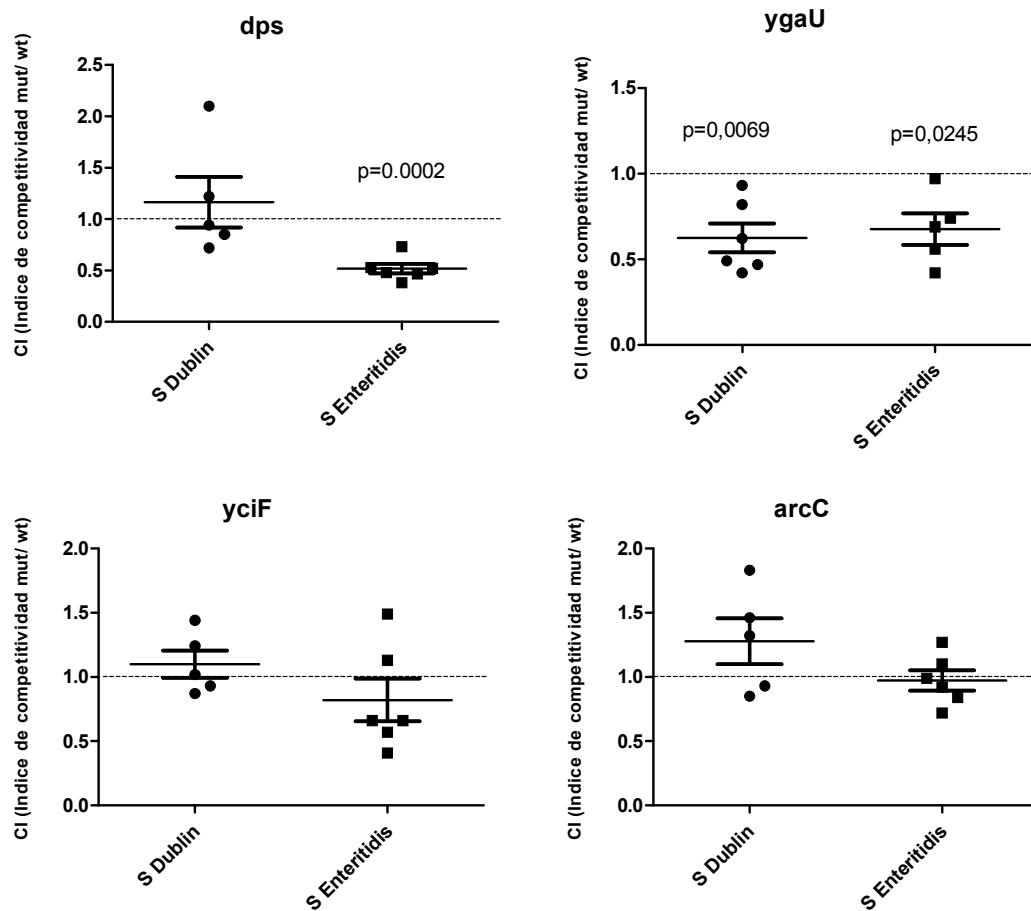
**Figura 18.** Curvas de crecimiento de cepas salvajes y mutantes nulos en gen *ygaU*, crecidas en medio de cultivo mínimo NaM9 con el agregado de dos concentraciones de diferentes de KCl (5Mm y 50Mm). A) Cepas de *S. Enteritidis* y B) cepas de *S. Dublin*.

### 3.8.- Evaluación de la invasividad de mutantes simples y dobles en ensayos de competencia en el modelo murino de salmonelosis invasiva.

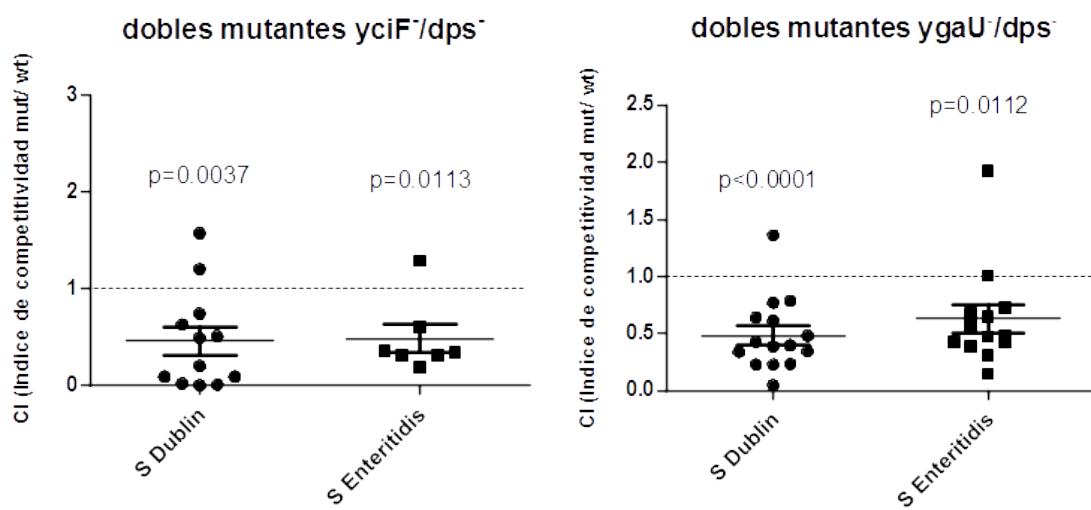
Los mutantes nulos construidos fueron evaluados en el modelo murino de salmonelosis invasiva de infección competitiva, para determinar si las mutaciones afectan la capacidad de las cepas de invadir los órganos internos respecto a la cepa parental (Figura 19). El mutante nulo *dps* solamente se vio afectado en su capacidad de invadir órganos internos de ratones en el serotipo Enteritidis.

Por otro lado el mutante nulo *ygaU* demostró estar afectado en la capacidad de invadir órganos internos de ratones en ambos serotipos, respecto a la cepa parental.

No encontramos diferencias entre la invasividad de los mutantes nulos *yciF::km<sup>R</sup>* y *arcC::cm<sup>R</sup>* en relación a las cepas salvajes en ninguno de los dos serovares (Figura 19). Dado los resultados *in vivo* de los mutantes simples, surgió la idea de estudiar si podría haber redundancia de funciones de las proteínas anuladas con roles de respuesta a estrés o que se sobre-expresan en esas condiciones. Entonces nos planteamos construir y evaluar en el modelo murino de salmonelosis los mutantes dobles *dps::cm<sup>R</sup>/yciF::km<sup>R</sup>* y *dps::cm<sup>R</sup>/ygaU::km<sup>R</sup>*. Los resultados se muestran en la figura 20, y como se puede apreciar tanto la cepa de *S. Dublin* como la de *S. Enteritidis* que tienen inactivados los genes *dps/ygaU* y *dps/yciF* simultáneamente están afectadas en su capacidad de invadir órganos internos respecto a la cepa parental. Sin embargo, para el caso del serovar Dublin, la diferencia entre wt y mutante parece ser más acusada que para el serovar Enteritidis (los valores p son menores).



**Figura 19.** Índice de competitividad entre los mutantes nulos y las correspondientes cepas salvajes en el modelo murino de salmonelosis en los fondos *S. Enteritidis* y *S. Dublin*. 5-6 ratones Balb/C se inocularon por vía intragástrica con  $2-5 \times 10^6$  UFCs /animal (relación 1:1 de wt y mutantes). Los ratones se sacrificaron 4 días post- infección, se removió bazo y se sembraron diluciones en medio rico. Se resembraron las colonias en medio rico con y sin antibiótico para los cálculos del índice de competitividad (CI). El CI se calcula como la razón UFCs del mutante/UFCs de wt en el bazo en relación a UFCs mutante/UFCs wt en el inóculo. Un CI=1 indica que la invasividad de las cepas evaluadas es similar, un CI<1 indica que el mutante es menos invasivo que la cepa wt y un CI>1 indica que el wt es menos invasivo que el mutante (estadístico one sample t test). Se indica con línea punteada el valor de 1, equivalente a igual invasividad entre mutante y parental. Las barras de error indican el error estándar de la media.



**Figura 20.** Índice de competitividad entre los dobles mutantes nulos y las correspondientes cepas salvajes en el modelo murino de salmonelosis en los fondos *S. Enteritidis* y *S. Dublin*. Se muestran resultados de dos experimentos independientes con 4-6 animales por grupo. Las barras indican el error estándar de la media. Estadístico one sample t test.

## Resultados de análisis de ArtI/ArtJ

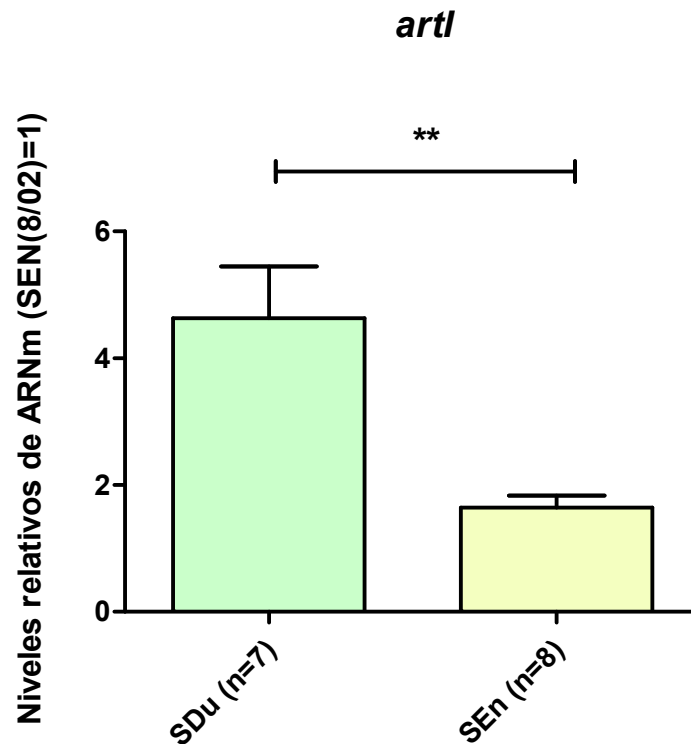
### 3.9.- Evaluación del posible rol de ArtI en la invasividad de *Salmonella*

Nuestro grupo de investigación demostró previamente que la proteína ArtI se encuentra sobre-representada en los proteomas de superficie de aislamientos de *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis* crecidos *in vitro*. El homólogo de ArtI de *E. coli* está reportado como integrante de un sistema de transporte específico de L-arginina localizado en el periplasma y codificado por los genes *artPIQMJ* (Wissenbach *et al.*, 1995). En ese mismo trabajo, aunque si bien se pudo determinar para ArtJ una elevada afinidad por la L-arginina, el sustrato para ArtI no se pudo determinar (Wissenbach *et al.*, 1995). Interesantemente, un artículo más reciente reporta que en *S. Typhimurium*, la L-arginina del medio aumenta los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMP cíclico y en consecuencia la síntesis del exopolisacárido celulosa (esencial para la formación de biofilm), proceso que requiere de la función de ArtI (Mills *et al.*, 2015).

En este trabajo, nos interesó por tanto evaluar si ArtI tiene un rol en la mayor capacidad invasiva de *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis*, para lo cual, en primer lugar determinamos si lo observado por proteómica se confirmaba con datos de niveles de ARNm y posteriormente evaluamos el fenotipo de mutantes nulos para el gen *artI* en ambos serotipos, en el modelo murino de salmonelosis.

### 3.9.1.- Niveles de ARNm para *artI* en S. Dublin y S. Enteritidis

Mediante RTqPCR se demostró que *artI* se expresa en mayor nivel en S. Dublin con respecto a S. Enteritidis, crecidas en medio rico LB hasta fase exponencial (Figura 21), apoyando este resultado los datos de proteómica.



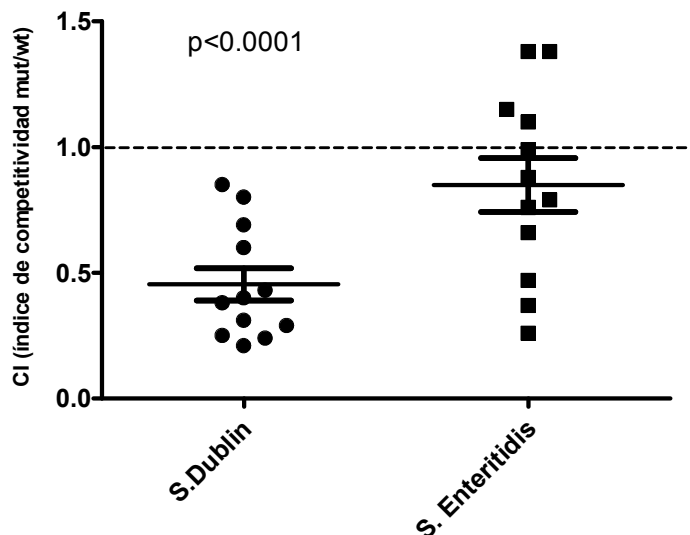
**Figura 21.** Niveles relativos de ARNm de *artI* en 7 cepas de S. Dublin (SDu) y 8 cepas de S. Enteritidis (SEn), con respecto a los niveles relativos de una cepa elegida arbitrariamente de SEn 8/02. \*\*  $p < 0.001$  (test Mann-Whitney). Las barras de error indican el error estándar de la media.

### 3.9.2.- Construcción de mutantes nulos en el gen *artI* y evaluación en el modelo murino de salmonelosis.

Se construyó un mutante nulo en *artI* en una cepa de S. Dublin (SDu3) y una de S. Enteritidis (SEn8/02) mediante la técnica de (Datsenko KA and Wanner BL, 2000). Se verificó la inserción del cassette de cloranfenicol en sustitución del gen *artI* por medio de 3 PCRs de la misma manera que los mutantes construidos anteriormente. Se constató que la movilidad, velocidad de crecimiento e integridad del LPS no estaban afectados en los mutantes nulos en *artI* en comparación con las cepas parentales.

Se evaluó la invasividad de los mutantes con respecto a las respectivas cepas salvajes en el modelo murino de salmonelosis invasiva por infección competitiva empleado en el capítulo 3.8, en dos experimentos independientes con 6 animales por grupo cada vez. Los resultados indican que el mutante nulo para *artI* en S. Dublin es significativamente menos invasivo que la

cepa salvaje, sin embargo en *S. Enteritidis* las diferencias entre mutante y salvaje no fueron significativas (CI similar a 1), (Figura 22). Este resultado sugiere que la proteína ArtI tiene un rol en la invasividad en el serovar Dublin, mientras que su rol es dispensable en el serovar Enteritidis.

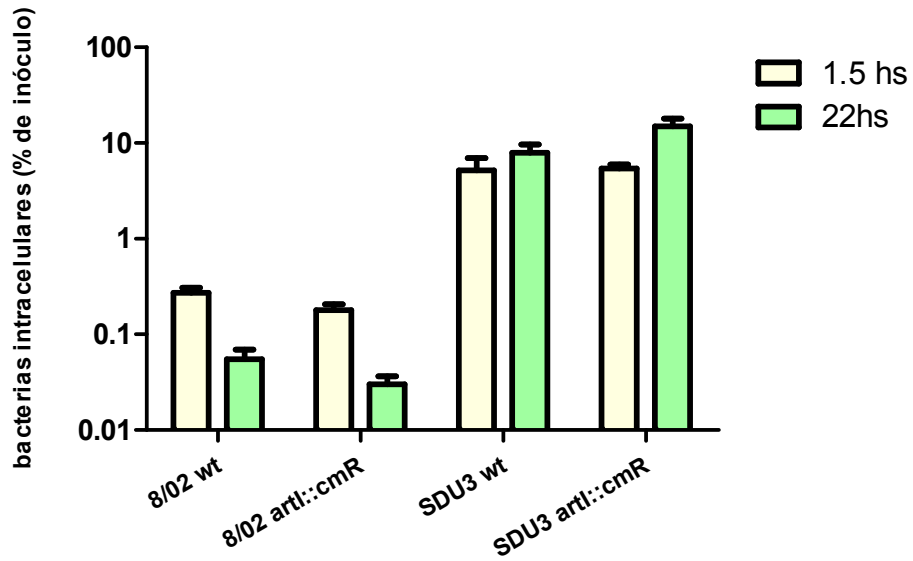


**Figura 22.** Índice de competitividad entre los mutantes nulos en el gen *artI* y las correspondientes cepas salvajes en el modelo murino de salmonelosis en los fondos *S. Enteritidis* y *S. Dublin*. Estadístico one sample t test. Las barras indican el error estándar de la media.

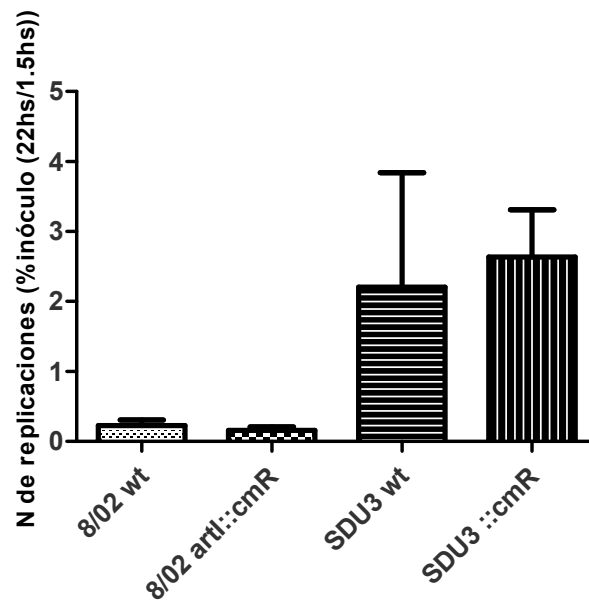
### 3.9.3.- Evaluación *in vitro* de los mutantes nulos *artI*.

Dado que el posible rol de ArtI consiste en el transporte de arginina hacia el interior bacteriano, y como a su vez la arginina es un sustrato de la enzima iNOS (inducible nitric oxide synthase), la cual actúa generando especies reactivas del nitrógeno en la vacuola donde se aloja *Salmonella* intracelularmente, hipotetizamos que ArtI actuaría secuestrando la arginina del medio intravacuolar limitando su accesibilidad para la iNOS. Esta función redundaría en una mayor supervivencia intracelular de *Salmonella* (propiedad que está directamente relacionada con la capacidad de diseminación sistémica de la bacteria). Por tanto, se estudió *in vitro* la capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos murinos (línea celular J774A) de los mutantes nulos *artI* en comparación con las respectivas cepas salvajes, en 2 ensayos independientes. Si bien se encontró una mayor capacidad de internalización y de supervivencia intracelular para el serotipo Dublin que para *S. Enteritidis*, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los mutantes y las respectivas cepas salvajes como se observa en la figuras 23 y 24.





**Figura 23.** Porcentaje de bacterias intracelulares recuperadas, en relación al inóculo bacteriano utilizado para infectar en cada pocillo (sembrado con aproximadamente  $2 \times 10^5$  macrófagos) a una MOI aprox 20, luego de 1,5 hs y 22 hs post-infección. Las barras simbolizan el promedio de los datos por triplicado en dos experimentos independientes. Las barras de error indican en error estándar de la media



**Figura 24.** Número de replicaciones calculado como porcentaje de bacterias intracelulares recuperadas a las 22 hs (en relación al inóculo bacteriano utilizado para infectar en cada pocillo), dividido lo recuperado a las 1,5 hs post-infección (22hs/1.5hs). Las barras simbolizan el promedio de los datos por triplicado en dos experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media.

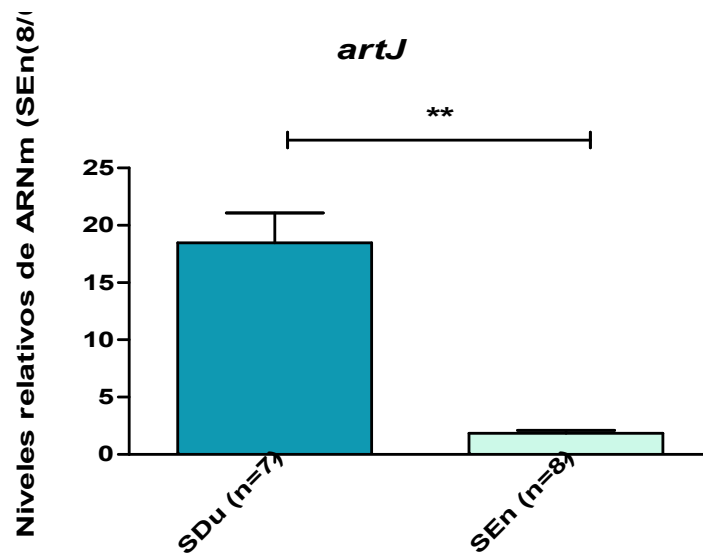
### 3.9.4.- Análisis de los niveles de ARNm para el gen *artJ* en *S. Dublin* y *S. Enteritidis*.

Está reportado para *E. coli* que ArtJ y ArtI formarían parte del mismo transportador de tipo ABC de localización periplásmica, específico para L-arginina. Por otro lado, mientras *artI* se encuentra localizado en un operón en el cual se hallan otros componentes del sistema de transporte (*artPIQM*), *artJ* se localiza en una unidad transcripcional independiente (Wissenbach *et al.*, 1995). En ese mismo trabajo se reporta la unión de ArtJ de manera específica y con elevada afinidad a la L-arginina. A nivel de secuencia de aminoácidos, ArtI y ArtJ poseen un 63% de identidad y un 79% de similitud (Figura 25).

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	337 bits (863)	3e-121	Compositional matrix adjust.	151/241 (63%)	191/241 (79%)	0/241 (0%)
ArtI	1	MKKVLI AALIAGFSL SATAAQTIRFATEASYPPFESMDANNKIVGFDV DLANALCKEIDA			60	
ArtJ	1	MKK+++AAL+A F+ + AA+ I F A+YPPFES+DA+NKIVGFD+DLA ALCK++ A			60	
ArtI	61	SCTFTNQAFDGLI PSLKFRRFNAVMAGMDITPEREKQVLF TTPYYDNSALFVGGQGYTS			120	
ArtJ	61	ECTFTNHAFDSLIPAL KFRKYDAVISGMDITPERSKQVAFSNPY YANSALVI AKKDTYKT			120	
ArtI	121	VDQLKGKKG VQNGTTHQKFIMDKHPEITV PYSYQNAKLDLQNGRIDAVFGDTAVVTE			180	
ArtJ	121	FTDLKGKRIGMENG TTHQKYLQDKHPEVKT VAYDSYQNAIIDLKNGRIDGVFGDTAVVNE			180	
ArtI	181	WLKANPKLAPVGD KVTDKDYFGTGLGI AVRQGNTELQQKFNTALEKVKKDGTYETIYNKW			240	
ArtJ	181	WLK NP+L P +KVTD YFGTGLGI AVR N L +K N AL +K DGTY+ I ++W			240	
ArtI	241	F 241				
ArtJ	241	F 241				

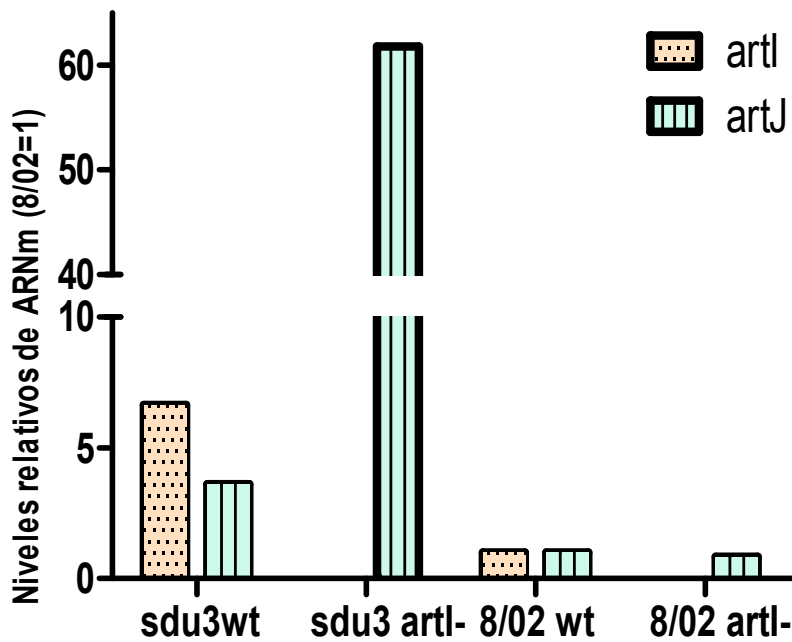
**Figura 25.** Alineamiento de secuencia de aminoácidos de ArtI y ArtJ de la cepa de *S. Dublin* CT\_02021853 usando el programa Blast2seq (NCBI)

En base a todo esto, hipotetizamos que *ArtJ* podría tener una función redundante con *ArtI*, y por tanto decidimos evaluar por RTqPCR los niveles de ARNm de *artJ* en ambos serotipos. Encontramos que *artJ* se sobre-expresa en *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis* (Figura 26), al igual que lo observado para el gen *artI*.



**Figura 26.** Niveles relativos de ARNm de *artJ* en 7 cepas de *S. Dublin* (SDu) y 8 cepas de *S. Enteritidis* (SEn), con respecto a los niveles relativos de una cepa arbitraria de SEn 8/02. \*\* valor  $p < 0.001$  (test Mann-Whitney). Las barras de error indica el error estándar de la media.

Con estos resultados nos interesó estudiar si la anulación de *artI* podría tener efecto en la expresión de *artJ*. Interesantemente cuando se anula el gen *artI* en el serotipo Dublin se observa una sobre-expresión de *artJ*, con respecto a la expresión de *artJ* en la cepa salvaje, lo cual no ocurre de igual manera en el serotipo Enteritidis donde los niveles de ARNm de *artJ* se mantienen constantes (Figura 27)



**Figura 27.** Niveles relativos de ARNm de *artI* y *artJ* en *S. Dublin* (SDu) wt y *artI::cm<sup>R</sup>*, *S. Enteritidis* (SEn) wt y *artI::cm<sup>R</sup>*, con respecto a los niveles relativos de una cepa elegida arbitrariamente de SEN (8/02).

#### Resumen de los resultados :

- 1- Encontramos diferencias importantes entre los proteomas de los serovares Dublin y Enteritidis en GMC.
- 2- Los resultados de RTqPCR apoyan los resultados de proteómica en la mayoría de los casos.
- 3- *S. Dublin*, el serovar más invasivo, produce mayores niveles de proteínas relacionadas a la respuesta a estrés, comparado con *S. Enteritidis*.
- 4- Los niveles de ARNm de los genes *dps*, *yciF*, *yciE*, *katN*, *ygaU* y *osmY* (regulados por RpoS) muestran un aumento en condiciones GMC respecto a condiciones óptimas de crecimiento significativamente mayor en *S. Dublin* que en *S. Enteritidis*.
- 5- *S. Dublin* resiste mejor al estrés oxidativo por presencia de peróxido de hidrógeno que *S. Enteritidis*.
- 6- La anulación del gen *dps* afecta la habilidad de resistir a estrés oxidativo en ambos serovares.

7- La anulación simple de *dps* afecta al serotipo Enteritidis no así a Dublin en el modelo murino.

8- La inactivación del gen *ygaU* afecta la invasividad de ambos serotipos

9- La inactivación individual de *yciF* o de *arcC* no afecta la capacidad invasiva en ninguno de los dos serotipos

10- El doble mutante *dps-/yciF-* esta atenuado en ambos serotipos

11- El mutante nulo *artI* resultó atenuado en el modelo murino para el caso del serovar Dublin

12- Cuando se inactiva el gen *artI* se da una sobreexpresión de *artJ* en las cepas del serovar Dublin

13- El serovar Dublin presenta mayores niveles de internalización y sobrevivencia en macrófagos.

14- Los mutantes *artI* no se encuentran afectados en su capacidad de internalización o sobrevivencia en macrófagos

## Capítulo 4.- Discusión.

### 4.1- Proteómica comparativa y análisis de niveles de ARNm.

Los serotipos Dublin y Enteritidis de *Salmonella enterica* están estrechamente relacionados filogenéticamente y tienen una gran homología a nivel genético, pero interesantemente tienen un comportamiento patogénico diferente. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue estudiar los factores moleculares involucrados en la determinación de estos distintos comportamientos patogénicos. La metodología elegida para abordar el problema consistió en el estudio comparativo de los proteomas de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* crecidos en condiciones relevantes para la infección. Cabe destacar que no hay reportados hasta el momento estudios proteómicos comparativos entre estos dos serotipos por lo cual nos pareció importante el aporte de este trabajo. Como se explicó anteriormente dos aislamientos naturales de cada serotipo se cultivaron en medio que imita las condiciones intestinales, ya que está bien aceptado que es en el intestino del hospedador donde se define la evolución que va a tener la enfermedad. Si bien somos conscientes de las limitaciones de esta técnica en lo que respecta a la sensibilidad (sólo se detectan aquellas proteínas más abundantes en la célula), mediante esta estrategia logramos identificar 9 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* y 7 proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis* (Tablas 6 y 7).

Los análisis de los niveles de ARNm de los genes que codifican para estas proteínas, realizados a partir de bacterias crecidas en las mismas condiciones de cultivo que los ensayos proteómicos, apoyan los resultados de la aproximación proteómica ya que 7 de los 9 genes que codifican para proteínas sobre-representadas en *S. Dublin*, también presentaron niveles de ARNm significativamente superiores a los encontrados en *S. Enteritidis* (Figura 10). Del mismo modo, 5 de los 7 genes que codifican para proteínas sobre-representadas en los proteomas de *Enteritidis* presentaron niveles mayores de ARNm en este serotipo (Figura 11). Por otro lado cuando las bacterias fueron crecidas en condiciones óptimas de crecimiento (medio rico LB y buena oxigenación), no se observaron diferencias en los niveles de ARNm entre serotipos, para la mayoría de los genes estudiados, excepto para *ygaU*, entre las proteínas sobre-representadas en Dublin y para *cpdB* y *fimA*, entre las sobre-representadas en *S. Enteritidis*.

La adaptación a las distintas condiciones adversas dentro del hospedador es crucial en la patogénesis de las infecciones por *Salmonella*. Por lo tanto es destacable que 6 de las 9 proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* (*Dps*, *YciF*, *YciE*, *KatN*, *YgaU* y *OsmY*) posiblemente cumplan funciones relacionadas con la protección frente a condiciones de estrés, condiciones en las cuales la bacteria debe sobrevivir en las distintas etapas de su ciclo

de vida dentro del hospedador (estrés ácido, osmótico, oxidativo, etc) (Rychlik and Barrow, 2005). Además, la expresión diferencial en condiciones similares a las encontradas *in vivo* y no así en medio rico, de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin*, es un resultado valioso que sugiere que las cepas del serovar *Dublin* se adaptan de manera más eficiente a las condiciones inhóspitas encontradas en el intestino del hospedador, activando la transcripción de genes involucrados en respuesta a estrés. Asimismo, condiciones de estrés oxidativo y ácido son encontradas en el fagosoma de las células fagocíticas, a través de las cuales *Salmonella* se disemina a órganos internos como el hígado y el bazo, y en las cuales principalmente se aloja en estos órganos. Por lo tanto el hecho de que *S. Dublin* produzca mayores niveles de proteínas implicadas en la resistencia frente a estas condiciones, podría ser un factor que contribuya a su mayor capacidad invasiva.

#### **4.2.- Proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis*.**

Entre las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* se destaca Dps (por las siglas en inglés “DNA-binding protein from starved cells”), cuya función reportada es la de protección del ADN frente a estrés oxidativo, térmico, ácido, nucleasas, etc. Dps posee dos mecanismos diferentes por los cuales proporciona protección a las bacterias. El primero se basa en la habilidad de unir y almacenar hierro, eliminando estos iones del citosol, no dejándolos disponibles para la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$ ) y finalmente atenuando la formación de radicales hidroxilo (Calhoun and Kwon, 2011). El segundo método es la capacidad de unirse al cromosoma de forma no específica, formando un co-cristal estable durante la fase estacionaria y protegiendo al ADN de daño oxidativo, radiación UV y gamma, toxicidad por hierro y cobre, estrés térmico y pH muy ácido o muy básico. Se ha estudiado la contribución de Dps a la resistencia a ácido causado por propionato (Calhoun *et al.*, 2010). Su estructura se asemeja mucho a las proteínas de la familia de las ferritinas, las cuales tienen actividad ferroxidasa y capacidad de almacenar hierro (Ilari *et al.*, 2002). También presenta una leve actividad catalasa (Almiron *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1999). Su expresión aumenta en presencia de estrés osmótico (Weber, Kögl and Jung, 2006)). Se ha encontrado Dps entre las proteínas más abundantes de membrana externa de *S. Enteritidis* y *S. Gallinarum* reportándose que es altamente antigénica (Cho *et al.*, 2014, 2015). Interesantemente, esta proteína de unión a DNA se había considerado clásicamente de localización citosólica y además carece de péptido señal, pero un trabajo publicado por Brown y col. demostró su localización a nivel de membrana externa en todas las condiciones de crecimiento ensayadas, indicando una posible actividad “moonlighting” (término referido a proteínas con más de una función biológica) (Brown *et al.*, 2012). Además, Halsey y col. demostraron que Dps promueve la supervivencia de *S.*

*Typhimurium* en macrófagos primarios murinos y el mutante nulo en *dps* se recuperó en menor nivel que la cepa salvaje de bazos e hígados de ratones infectados (Halsey *et al.*, 2004). Dadas las funciones reportadas para esta proteína nos interesó estudiar el rol que podría cumplir en los dos serotipos de *Salmonella enterica* estudiados en este trabajo y en especial en el serotipo Dublin donde encontramos que está sobre-representada a nivel proteómico cuando las bacterias son crecidas en condiciones GMC. Con este fin anulamos el gen que la codifica, *dps*, en el cromosoma de ambos serotipos. Pudimos corroborar en este trabajo la función de respuesta a estrés oxidativo de la proteína Dps reportada en la bibliografía (Halsey *et al.*, 2004), en este caso tanto para *S. Dublin* como para *S. Enteritidis*, ya que en el experimento de supervivencia a estrés oxidativo causado por exposición a peróxido de hidrógeno se observó que los mutantes nulos en el gen *dps* sobrevivieron significativamente menos que las salvajes (Figura 17). Adicionalmente, este experimento reveló que *S. Enteritidis* salvaje sobrevive menos que *S. Dublin* en estas condiciones, sugiriendo que *S. Dublin* estaría mejor preparado para sobrellevar estas condiciones. Esto es destacable ya que la resistencia a estrés oxidativo juega un papel importante en la habilidad de *Salmonella* de resistir la muerte dentro de los macrófagos del hospedero y poder así diseminarse a órganos internos (Hébrard *et al.*, 2009).

Por otro lado, en nuestros ensayos en el modelo murino de salmonelosis observamos que la anulación del gen *dps* solamente afectó al mutante en el serotipo Enteritidis, mientras que en el serovar Dublin el mutante *dps* no mostró diferencias respecto a la cepa parental (Figura 19). Este resultado es sorprendente dado que en la bibliografía se ha demostrado que Dps participa en la virulencia de *S. Typhimurium*, (Halsey *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2009). Sin embargo, analizando la bibliografía, no se encuentran hasta este momento reportes acerca del rol de Dps en la invasividad de *S. Enteritidis* ni *S. Dublin*. El hecho de que en el serotipo Dublin la anulación de este gen no afecte la capacidad de invadir órganos internos murinos podría ser explicado por la redundancia en la función de este gen con otros genes. En este sentido, cuando anulamos el gen *dps* junto a *yciF* (*dps::cm<sup>R</sup>/yciF::km<sup>R</sup>*) otro gen que codifica para una proteína que al igual que Dps están relacionada con la respuesta a estrés y que encontramos sobre-representada en el serovar Dublin, los dobles mutantes resultantes sí se vieron afectados en la invasividad en ambos serovares (Figura 20). Este resultado sugiere un posible efecto sinérgico entre ambas proteínas.

Siguiendo con la descripción de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* respecto a *S. Enteritidis* encontramos a YciF, YciE y KatN. Estas tres proteínas están codificadas en un mismo operón *yciGFEkatN* (Robbe-Saule *et al.*, 2001). En *S. Typhimurium* su expresión aumenta en presencia de bilis (Prouty *et al.*, 2004) y se encuentra regulado por el factor sigma alternativo



( $\sigma^S$  o RpoS) (Robbe-Saule *et al.*, 2001; Beraud *et al.*, 2010). La proteína YciG que está codificada en el mismo operón no fue detectada en este trabajo quizás debido a que su punto isoeléctrico 9.99 no está dentro del rango de separación en la primera dimensión de nuestro análisis proteómico (rango de pH 4-7) (Beraud *et al.*, 2010).

La función de YciF es aún desconocida pero se conoce la estructura cristalina a 2.0 Å de la proteína homóloga en *E. coli* y basados en la comparación estructural con rubrerythrin, una proteína que tiene un centro dihierro y a proteínas de la familia de las ferritinas y mono-oxygenasas que tienen unión a metales, se hipotetiza que YciF es una proteína de unión a metales (Hindupur *et al.*, 2006). Además, su homóloga en *E. coli* se sobre-produce en condiciones de estrés osmótico (Weber, Kögl and Jung, 2006).

YciF fue otra de las proteínas seleccionadas en este trabajo para estudiar su rol en la invasividad de *S. Dublin* y *S. Enteritidis*. Según las características estructurales de su proteína homóloga en *E. coli*, podría tener un rol hipotético en la protección de la célula al daño oxidativo, ya que tiene similitud a un dominio catalasa en la proteína bll3758 de *Bradyrhizobium japonicum* (Hindupur *et al.*, 2006). Sin embargo en nuestros análisis, la supervivencia a estrés oxidativo de los mutantes nulos en *yciF* fue similar a la de las cepas salvajes parentales tanto en *S. Dublin* como en *S. Enteritidis* (Figura 17). Por otro lado la inactivación de este gen no afectó la capacidad de los mutantes de invadir el bazo de ratones coinfectados con el mutante y la respectiva cepa parental, en ninguno de los dos serovares (Figura 19). No hay estudios de este tipo en la bibliografía, aunque Encheva y colaboradores sugirieron que YciF podría estar involucrada en los procesos de invasión o supervivencia dentro del hospedador basados en la observación de que se ha visto sobre-representada en los proteomas de aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* comparados con cepas de referencia (Encheva *et al.*, 2007). Sin embargo cuando anulamos *yciF* simultáneamente con *dps* observamos un fenotipo atenuado tanto en *S. Dublin* como en *S. Enteritidis* (Figura 20). Este resultado es interesante en *S. Dublin*, porque los mutantes simples no estaban atenuados, sugiriendo que el efecto por separado de estas proteínas es sutil, pero que las bacterias necesitan de las dos funciones que cumplen estas proteínas (que pueden ser redundantes o no) para su capacidad invasiva. Interesantemente, se ha reportado la inducción de la expresión de numerosos genes con posibles roles en resistencia a estrés oxidativo en *Salmonella Typhimurium* aislada de macrófagos primarios murinos. Mutantes nulos simples en esos genes, si bien mostraron fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo in vitro, no se encontraron atenuados en infecciones intravenosas en murinos, sugiriendo redundancia en las funciones de éstos (Wright *et al.*, 2009).

KatN, otra de las proteínas que forma parte del operón *yciEFG KatN* y que encontramos sobre-representada en *S. Dublin*, es una catalasa que a diferencia de otras catalasas no tiene un

grupo prostético hemo en su sitio activo y que une manganeso en su mecanismo catalítico. Esta proteína está regulada también por RpoS (Robbe-Saule et al., 2001). *Salmonella* posee numerosos mecanismos de defensas para eliminar o degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) generado como producto del metabolismo aeróbico o por NADPH oxidasas de los fagocitos. Mediante estudios genómicos se han encontrado en *S. Typhimurium* tres catalasas (KatE, KatG y KatN), que están involucradas en la reducción de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno, y dos alkyl hydroperóxido reductasas (AhpC and TsaA) (Hébrard et al., 2009).

Hébrard y colaboradores observaron que mutantes simples de *S. Typhimurium* en estas enzimas no mostraron susceptibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero como era de esperar el mutante que tiene anulados los cinco genes que codifican para las enzimas que degradan a este compuesto, es incapaz de degradarlo en concentraciones micromolares. Además este mutante no muestra proliferación dentro de macrófagos y tiene reducida la virulencia en ratones, fenotipo que no se observa en los mutantes simples. Estas observaciones sugieren que las catalasas y alkil hidroperóxido reductasas forman un arsenal antioxidante redundante para la supervivencia y replicación de *S. Typhimurium* dentro de las células del hospedero (Hébrard et al., 2009).

Otra de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* y seleccionada para estudiar en este trabajo fue YgaU. La bibliografía relacionada a esta proteína es escasa. Su función se desconoce en *Salmonella*, mientras que en el caso de *Escherichia coli* se ha reportado que participa en la remodelación del peptidoglicano en condiciones de estrés en la envoltura y como un sensor citosólico de potasio (Bernal-Cabas, Ayala and Raivio, 2015; Ashraf et al., 2016). Posee un dominio BON (bacterial OsmY and nodulation) que le permiten anclarse a fosfolípidos de membrana y un dominio LysM, descrito en proteínas de unión a peptidoglicano. Su homóloga en *E.coli* también se sobre-produce en condiciones de estrés osmótico (Weber et al., 2006). Rosenkrantz y colaboradores analizaron en *S. Typhimurium* la respuesta transcripcional a 8 diferentes condiciones de crecimiento y estrés, y encontraron que *ygaU* fue el único gen que mostró una expresión significativamente diferente en todas las condiciones evaluadas con respecto a la condición control. Se sobre-expresó en condiciones de estrés ácido, oxidativo, osmótico y por calor e inmovilización y en fase estacionaria de crecimiento, y se sub-expresó en fase exponencial de crecimiento y en anaerobiosis. Sin embargo no lograron construir un mutante nulo en este gen por lo cual no pudieron evaluar la importancia de este gen en la adaptación a estrés (Rosenkrantz et al., 2013). Este gen está regulado también por RpoS (Ibanez-Ruiz et al., 2000). En nuestros ensayos el mutante nulo *ygaU* está atenuado respecto a la cepa parental en la capacidad de invadir órganos internos de ratones en los dos serotipos utilizados en este trabajo (Figura 19). Sin embargo, un estudio exhaustivo de los genes esenciales para la virulencia de *S. Typhimurium* en ratones Balb/C

excluye al gen *ygaU* como esencial (Chaudhuri *et al.*, 2009). De todos modos, en ese trabajo, la inoculación de los animales fue hecha por vía intravenosa (a diferencia de nuestro caso que fue por vía intragástrica), y los animales sacrificados a 2 días p.i. (mientras que en nuestros ensayos los ratones fueron sacrificados a 4 días p.i.). No hay datos publicados hasta el momento sobre la importancia de este gen en la virulencia de serotipos de *Salmonella* diferentes a *S. Typhimurium*. Por lo tanto nuestros resultados resultan novedosos y planeamos como perspectiva caracterizar más en profundidad la función de esta proteína.

OsmY, otra de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis*, es una proteína periplásmica con dos dominios BON. Una hipótesis es que OsmY en *E. coli* previene la contracción del citoplasma al contactar los fosfolípidos que rodean el espacio periplásmico. Esto evitaría físicamente que la membrana interna se encoja al unirla a la membrana exterior más rígida (Zheng *et al.*, 2015). La expresión del gen *osmY* en *Escherichia coli* se induce en condiciones de estrés osmótico y es regulada por RpoS (Yim and Villarejo, 1992; Yim, Brems and Villarejo, 1994; Weber, Kögl and Jung, 2006). Zheng y colaboradores detectaron OsmY en *S. Typhi* y observaron que al igual que en *E. coli* su expresión es dependiente de RpoS y activada en fase estacionaria de crecimiento. También demostraron que esta proteína se induce en condiciones de inducción de SPI-2, una isla de patogenicidad de *Salmonella* que codifica para un sistema de secreción T3SS y que juega rol crucial en la sobrevivencia dentro de macrófagos (de Jong *et al.*, 2012). Su inducción puede observarse *in vitro* en un medio con baja concentración de fosfato y magnesio a pH 5.8, indicando que OsmY podría cumplir un rol en la resistencia a estrés y favorecer la replicación de *Salmonella* dentro de los macrófagos (Zheng *et al.*, 2015).

LpxR, también sobre-representada en el serotipo Dublin, tiene una función en la modificación del lípido A lo cual podría tener un rol en la supervivencia intra-macrófago y en la evasión del sistema inmune (Kawano, Manabe and Kawasaki, 2010; Kawasaki *et al.*, 2012).

FruF otra de las proteínas sobre-representadas en Dublin, es la subunidad IIA/ HPr del sistema de transporte de fructosa PTS (phosphotransferase system). En *S. Typhimurium* y *E. coli* varios carbohidratos son obtenidos por el sistema PTS. Durante el transporte a través de la membrana plasmática los substratos son fosforilados. El grupo fosforilo es transferido del fosfoenolpiruvato al carbohidrato a través de varias proteínas, algunas de las cuales son citoplasmáticas como FruF, y otras asociadas a membrana (Geerse, Izzo and Postma, 1989). La implicancia de este sistema de transporte en la virulencia de *Salmonella* no está estudiada, pero se ha observado que el sistema de transporte de fructosa PTS está involucrado en la virulencia de varios *Streptococcus* incluido el patógeno humano *Streptococcus pyogenes* (Valdes *et al.*, 2016).

Por último, la enolasa es una enzima implicada en el metabolismo de la glucosa. Aunque remarcablemente, es otra proteína que ha sido clasificada como “moonlighting” en varios géneros bacterianos, por su posible rol en la virulencia dada su localización en la superficie bacteriana y su unión al plasminógeno humano (Henderson and Martin, 2011), favoreciendo la conversión del plasminógeno en plasmina (una serina proteasa) que es usada por los patógenos para penetrar los tejidos y degradar los componentes mayores de la matriz extracelular de las células del hospedero, facilitando la invasión. Se le ha atribuido un rol en la patogenicidad de distintas bacterias como *S. Typhi* (Pancholi, Fontan and Jin, 2003; Chauhan *et al.*, 2012)

En resumen, entre las proteínas sobre-representadas en el serovar Dublin, hay una gran proporción de proteínas implicadas en resistencia a estrés y virulencia. Es interesante destacar aquí un trabajo donde se analizan comparativamente por RNAseq los transcriptomas de dos grupos de aislamientos del serovar Enteritidis bien caracterizados fenotípicamente y clasificados como de “reducida patogenicidad” y “elevada patogenicidad”, encontrándose en los primeros niveles de expresión significativamente menores respecto a los segundos para varios de los genes que codifican para las proteínas aquí identificadas (Dps, YciE, YciF, YgaU y OsmY) (Shah, 2014).

#### **4.3.- Proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis* con respecto a *S. Dublin*.**

Por otra parte, entre las 7 proteínas que aparecen sobre-representadas en el serotipo Enteritidis (Tabla 7), destacan ADI, OTC y CK, que forman parte de un mismo operón y se encuentran involucradas en una vía de degradación de arginina (vía ADI). Mediante esta vía la arginina es catabolizada a citrulina por ADI codificada en el gen *arcA*, la cual es hidrolizada a ornitina y fosfato por la enzima ornitina carbamoiltransferasa (OTC) codificada por *arcB* y finalmente el fosfato es transferido del carbamoil fosfato al adenosín difosfato (ADP) por la enzima carbamato kinasa (CK) codificada por *arcC*, con la producción de amoníaco, anhídrido carbónico y ATP. Esta es una de las vías alternativas para la producción energética en bacterias, particularmente en condiciones de limitación de oxígeno, y está ampliamente distribuida entre los organismos procariotas (Cunin *et al.*, 1986). Algunas de las hipótesis que se pueden hacer sobre por qué *S. Enteritidis* sobre-expresa esta vía de degradación de la arginina podrían ser que le diera una ventaja energética para proliferar a nivel intestinal, ya que una molécula de ATP es producida por cada molécula de arginina. Nuccio y Baumler realizaron un estudio de genómica comparativa en *Salmonella* y encontraron un conjunto de 469 genes involucrados en el metabolismo anaeróbico central, los cuales se encuentran intactos en los serovares que

causan una enfermedad localizada a nivel gastrointestinal pero en vías de degradación en los que causan una enfermedad extra-intestinal. Los autores postulan que las vías metabólicas en las que participan estos genes permiten a los patógenos gastrointestinales proliferar en el intestino utilizando nutrientes derivados de la inflamación y que aquellos patógenos extra-intestinales las están perdiendo porque no tienen una fase intestinal de crecimiento tan marcada. Entre estos 469 genes encontraron los que codifican para ADI, OTC y CK (Nuccio and Bäumler, 2014).

Por otro lado, en el segundo paso de esta vía se forma L-ornitina, la cual puede ser degradada a la poliamina putrescina. Aunque las poliaminas pueden ser sintetizadas a través de vías alternativas, la reacción en un paso de ornitina a putrescina podría tener ventajas durante la infección. Además, la producción de amoníaco en el último paso de la vía ADI puede conducir a la producción de  $\text{NH}_4^+$ , incrementando el pH citoplasmático y de esa manera protegiendo a la bacteria de las condiciones ácidas dentro del hospedero. En este sentido, la producción de ATP puede proveer de energía para bombear protones citoplasmáticos y mantener la homeostasis del pH en el citosol (Xiong *et al.*, 2016).

Además de la función metabólica, la utilización del sistema Arginina deiminasa (sistema ADI) ha sido implicado en la virulencia de distintos patógenos, incluyendo *Salmonella* Typhimurium, en la cual se observa que mutantes delecionados en el gen *arcA* están atenuados en la virulencia en un modelo murino cuando son inoculados por vía intraperitoneal (Choi *et al.*, 2012).

En este trabajo decidimos por tanto anular el gen *arcC* que codifica para la carbamato kinasa, involucrada en el último paso de la vía ADI de degradación de la arginina, en el cromosoma de una cepa de cada serotipo. Sin embargo, en el modelo murino de salmonelosis empleado en este trabajo (ratones BalbC, inoculación intragástrica) no observamos efecto en la invasión de los mutantes nulos en *arcC* con respecto a la cepa salvaje, en ninguno de los dos serovares (Figura 19). Es posible que el efecto de la inactivación de esta vía metabólica ejerza un efecto atenuante en la capacidad de colonizar el intestino de los animales infectados, pero esta propiedad no se evalúa en el modelo de salmonelosis invasiva utilizado. Como perspectiva de este trabajo nos planteamos evaluar el fenotipo de los mutantes *arcC* en el modelo de colitis en ratón, en el cual *Salmonella* desencadena una respuesta inflamatoria aguda a nivel del ciego de los ratones infectados.

La sobre-representación de esta vía en el serotipo Enteritidis a nivel proteico es comparable a los resultados de un estudio de proteómica comparativa realizado por Sonck y colaboradores en el que encontraron que las enzimas ADI, OTC y CK estaban sobre-representadas en cepas de *S. Typhimurium* (serotipo con rango de hospedero y capacidad epidémica similar a *S. Enteriti-*

dis), crecidas en condiciones que imitan las intestinales (baja tensión de oxígeno y alta concentración de sales) en comparación con condiciones estándar de laboratorio. En este mismo trabajo también encontraron sobre-representadas en las mismas condiciones a las proteínas CpdB, OsmY y DPS (Sonck *et al.*, 2009). Interesantemente, nuestros resultados de los ensayos de qPCR indican que el serovar Enteritidis sobre-expresa los genes codificantes para ADI, OTC, CK y CpdB en condiciones GMC respecto a condiciones estándar de laboratorio, y que esta sobre-expresión es significativamente mayor que la observada en el serovar Dublin (figura 13).

Otra de las proteínas que encontramos sobre-representada en *S. Enteritidis* es FimA. Es la subunidad mayor de la fimbria tipo 1 y se ha reportado que en *S. Typhimurium* el cluster de genes *fim* consta de un operón con seis genes (*fimAICDHF*), que codifican para componentes estructurales y de ensamblaje de las fimbrias, y tres genes regulatorios que se transcriben independientemente (*fimZ*, *fimY* y *fimW*) (Saini, Pearl and Rao, 2009; Zeiner, Dwyer and Clegg, 2012). Las fimbrias son apéndices encontrados en la superficie de muchas bacterias entéricas y les permiten anclarse a la superficie de células eucariotas. Kuzminska-Bajor y colaboradores llevaron a cabo estudios *in vivo* infectando ratones con *S. Enteritidis* salvaje y mutante nulo en *fimH* (componente estructural de las fimbrias con la función de adhesión) y observaron que cuando se expresa la fimbria, la invasividad es menor y tiene menor potencial de producir diseminación sistémica. Encontraron también una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias en células intestinales murinas infectadas con la cepa salvaje en comparación con células infectadas con el mutante nulo en *fimH*. Por lo tanto la presencia de fimbria tipo 1 se traduce en una mayor respuesta inflamatoria, favoreciendo la sobrevida en el tracto intestinal y limitando la infección a este ambiente (Kuzminska-Bajor, Grzymajlo and Ugorski, 2015). Un estudio más en profundidad acerca del rol de la proteína FimA en las diferencias patogénicas exhibidas por los serovares Dublin y Enteritidis nos parece muy interesante y por razones de tiempo no fueron llevadas a cabo en este trabajo, pero tenemos como perspectiva su estudio en un futuro cercano.

Otra proteína sobre-representada en *S. Enteritidis* es FkIB, una enzima que no se ha estudiado en *Salmonella* pero es del tipo PPIasa (peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa), que son enzimas cuya función es la catálisis de las posiciones *cis-trans* de los enlaces peptídicos. La isomerización de los residuos de prolina es un paso limitante en el plegamiento de proteínas, razón por la cual este tipo de enzimas se encuentran en todos los reinos de la naturaleza (Fanghänel and Fischer, 2004). El rol de esta proteína en el intestino del serovar Enteritidis queda por elucidar por lo tanto surge como perspectiva evaluar el rol de esta proteína en la capacidad de proliferación intestinal.

CpdB es una enzima bifuncional que posee actividad 2'3' fosfodiesterasa (cataliza la hidrólisis de 2'3' fosfatos cíclicos de adenosina, guanosina, citosina y uridina en 3'AMP) y tiene también actividad 3' nucleotidasa. Recientemente se ha reportado que esta enzima está involucrada en la colonización a largo plazo del intestino de pollos así como de órganos internos por *Salmonella Pullorum* (Liu *et al.*, 2015).

Por último otra de las proteínas sobre-representadas en *S. Enteritidis* es la glutatión reductasa (Gor) que reduce GSSG (glutatión disulfuro) para formar GSH (glutatión en su forma sulfhidrilo). Está reportado que GSH es un tiol de bajo peso molecular involucrado en la resistencia a especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Masip, Veeravalli and Georgiou, 2006). Sin embargo Song y colaboradores encontraron que al tratar *Salmonella* con óxido nítrico solamente el 5% del total de GSH es oxidado a GSSG y que mutantes nulos en el gen *gor* (que codifica para la glutatión reductasa) no mostraron susceptibilidad ni a peróxido de hidrógeno ni a óxido nítrico, por lo cual esta enzima no parece ser de importancia en la defensa de *Salmonella* frente al estrés oxidativo (Song *et al.*, 2014).

Las últimas 2 proteínas que describimos (CpdB y Gor) sobre-representadas en *S. Enteritidis* así como LpxR y Eno entre las sobre-representadas en *S. Dublin*, no mostraron diferencias a nivel de ARNm en medio GMC entre ambos serotipos, lo cual no significa necesariamente que los resultados de proteómica sean equívocos, sino que pueden existir mecanismos de regulación post-transcripcional (por ejemplo pequeños RNAs reguladores que inhiban la unión del ribosoma, distinta eficiencia de traducción, distinta estabilidad de la proteína, etc) que resulten en niveles diferentes de proteínas para niveles similares de ARNm.

#### **4.4.- Factor sigma alternativo RpoS.**

Como se ha mencionado anteriormente en la descripción de cada una de las proteínas, varias de las proteínas sobre-representadas en *S. Dublin* (Dps, YciF, YciE, KatN, YgaU, OsmY) son reguladas por el factor sigma alternativo RpoS (Yim, Brems and Villarejo, 1994; Ibanez-Ruiz *et al.*, 2000; Robbe-saule and Coynault, 2001; Lévi-Meyrueis *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015). En bacterias la transcripción depende de la ARN polimerasa, la cual posee un núcleo catalítico o enzima E que está formado por las subunidades  $\alpha_2 \beta \beta' \omega$  y que se asocia con varios factores  $\sigma$  para formar diferentes holoenzimas (Bae *et al.*, 2015). Los factores sigma son requeridos para la unión específica y el direccionamiento de la ARN polimerasa a diferentes clases de promotores, modulando de este modo los patrones de expresión génica. Por ejemplo la holoenzima que contiene el factor  $\sigma^{70}$  es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes durante la fase exponencial de crecimiento. Pero cuando las bacterias entran en fase

estacionaria o bajo condiciones específicas de estrés, el factor  $\sigma^S$  alternativo (RpoS) codificado por el gen *rpoS* se torna más abundante, se asocia con el núcleo de la ARN polimerasa y direcciona la transcripción de genes esenciales para la respuesta a estrés. Es interesante y tiene sentido que los genes *dps*, *yciF*, *yciE*, *katN*, *ygaU*, *osmY* se expresen en mayor medida en las condiciones que imitan el intestino (Figura 12), ya que son éstos los genes reportados como controlados por RpoS, que se induce tanto en condiciones de estrés osmótico como por una reducción en la velocidad de crecimiento, ambos factores presentes en la condición GMC.

RpoS es el regulador maestro de la respuesta general a estrés de muchas bacterias gram negativas (Gruber and Gross, 2003) y afecta directa o indirectamente la abundancia de proteínas involucradas en una variedad de procesos incluidos metabolismo, tráfico de membrana, regulación y resistencia a estrés (Battesti, Majdalani and Gottesman, 2011). Ha sido reportado que RpoS modula el 38% del proteoma en *S. Typhimurium* (Lago *et al.*, 2017). Mediante la comparación del proteoma de cepas salvajes de este serotipo con el de un mutante nulo en *rpoS* se encontraron efectos positivos de RpoS en la transcripción de genes involucrados en metabolismo energético central (glucólisis, vía pentosa fosfato, y fermentación ácido mixta), metabolismo de glicógeno y trehalosa, degradación de arginina, síntesis y degradación de putrescina y vías antioxidantes (catalasas, superóxido dismutasa, etc).

En nuestro trabajo analizamos los niveles de ARNm de RpoS de las cepas de ambos serotipos, crecidas en las mismas condiciones utilizadas en los análisis proteómicos y no encontramos diferencias en la expresión de este gen entre serotipos (Figura 14). Interesantemente se ha observado que en *E. coli* la sobre-expresión de RpoS no es suficiente para la inducción de muchos de los genes regulados por este factor de transcripción. Los promotores dependientes de RpoS requieren de la molécula guanosine tetraphosphate para su inducción (Kvint, Farewell and Nyström, 2000). Hipotetizamos que la diferente expresión de los genes que están bajo su regulación podría ser explicado por una regulación post transcripcional de RpoS. En este sentido comparamos las secuencias shine-dalgarno asociadas al gen *rpoS* en los genomas de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* utilizadas en este trabajo. Estas secuencias son propias de los ARNm procariotas y constan de 6 o 7 nucleótidos antes del codón inicio de la traducción, complementarias a una zona del 3' de ARN ribosomal 16S y que regula la iniciación de ésta (Chen *et al.*, 1994). Sin embargo las secuencias shine dalgarno del gen *rpoS* en los genomas de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* son idénticas, por lo tanto descartamos que pudiera haber diferencias en la traducción de *rpoS* causadas por variaciones en esta secuencia (Datos no mostrados). Analizamos también las regiones predichas como promotoras de los genes que codifican para las proteínas que encontramos diferencialmente representadas entre serotipos en este trabajo, buscando diferen-



cias nucleotídicas que pudieran explicar distinta afinidad de la ARN polimerasa por los promotores explicando así diferencias en la transcripción de estos genes entre serovares. Sin embargo no encontramos en esas regiones SNP (Single Nucleotide Polymorphism) entre *S. Dublin* y *S. Enteritidis* (Datos no mostrados).

De todos modos, los circuitos regulatorios que se centran en el regulón controlado por RpoS son muy complejos y actúan a nivel de transcripción, traducción, degradación y regulación de su actividad (Battesti, Majdalani and Gottesman, 2011). Se ha visto también que RpoS es requerido para la virulencia en *Salmonella* spp (Dong and Schellhorn, 2010). Otras moléculas participan además de RpoS en la regulación de la transcripción de nuestras proteínas en estudio. Por ejemplo para el caso de *Dps*, existe en *Salmonella enterica* un regulador negativo de la transcripción de *rpoS* denominado FIS, el cual es abundante en fase exponencial y muy escaso en fase estacionaria (Hirsch and Elliott, 2005). Se ha encontrado también una proteína denominada YncC, la cual se une corriente arriba del promotor del operón *yciGF<sub>Ek</sub>atN* y controla la producción de las proteínas codificadas por este operón a nivel transcripcional actuando junto con RpoS y activando su transcripción en *Salmonella*. Se ha visto que esta proteína es un factor limitante para la expresión de *yciGF<sub>Ek</sub>atN* y el impacto de YncC es mayor a bajas concentraciones de RpoS como sucede en la fase exponencial de crecimiento (Beraud *et al.*, 2010). A su vez RpoS controla la expresión de *yncC*, por lo que *yciGF<sub>Ek</sub>atN* es regulado por medio de un circuito de alimentación positiva dependiente de RpoS (Ibanez-Ruiz *et al.*, 2000). La secuencia de la región de unión de YncC es 100% idéntica en los genomas de *S. enterica* subsp. *enterica*, habiendo solo una sustitución en los grupos más ancestrales *S. enterica* subsp. *arizonae* y *S. bongori* (Chan *et al.*, 2003). Por otro lado H-NS es una proteína similar a las histonas que se une al ADN oligomerizando y formando un extenso complejo nucleoproteico que causa la represión de genes. H-NS se une al locus *yciGF<sub>Ek</sub>atN* y reprime su expresión (Beraud *et al.*, 2010). Por lo tanto se puede deducir que la regulación de la expresión de los genes controlados por RpoS es compleja habiendo para cada gen diversos actores que influyen en el resultado que vemos a nivel de proteínas.

En resumen los resultados de este capítulo indican que hay un conjunto de proteínas diferencialmente representadas entre los proteomas de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* crecidas en condiciones similares a las encontradas *in vivo*. El proteoma del serovar *Dublin* está claramente enriquecido en proteínas implicadas en respuesta a diferentes condiciones de estrés, que *Salmonella* encuentra en los distintos pasos de su ciclo infeccioso. Además, este serovar responde de manera más eficiente a la presencia de esas condiciones, expresando estos genes en niveles significativamente mayores que *S. Enteritidis*. Entre los genes estudiados, *ygaU*, *dps*

e *yciF* de forma aislada o en conjunto afectan positivamente la invasividad de *Salmonella*, y la cepa del serotipo Dublin muestra mayor atenuación que Enteritidis cuando estos genes son inactivados de a pares.

#### **4.5.- Análisis de ArtI y ArtJ.**

La segunda parte de este trabajo se desarrolló a partir de la descripción previa realizada por nuestro grupo de trabajo, de la proteína ArtI, sobre-representada en los proteomas de superficie de *S. Dublin* con respecto a *S. Enteritidis* (Figura 3).

Como se describió en la sección resultados, ArtI está anotada en el genoma de *Salmonella enterica* como una putativa proteína periplásmica de unión a arginina. Asimismo existe otra proteína, denominada ArtJ, con elevada homología con ArtI, anotada con la misma función y sus proteínas ArtI y ArtJ en *E. coli* forman parte del sistema de transporte Art, dependiente de unión a proteína, específico para L-arginina (Wissenbach *et al.*, 1995). Sin embargo, no hay bibliografía acerca de la función que desempeñan estas proteínas en el género *Salmonella*.

Los análisis por RTqPCR de los genes *artI* y *artJ*, en 7 cepas de *S. Dublin* y 8 cepas de *S. Enteritidis*, mostraron que los niveles de ARNm son significativamente mayores en *S. Dublin* que en *S. Enteritidis* (4 y 7 veces más respectivamente) para ambos genes (Figuras 21 y 26). Este resultado para el caso de *artI* apoya el resultado de la proteómica comparativa.

Otro resultado interesante fue que al inactivar *artI* la expresión de *artJ* aumentó significativamente en *S. Dublin* y no así en *S. Enteritidis*, lo cual sugiere que la función que cumplen estos genes es redundante y de importancia en *S. Dublin* (Figura 27).

La arginina es un modulador esencial de la respuesta inmune frente a infecciones. La actividad de iNOS depende de la disponibilidad de este aminoácido. Por lo tanto, la cantidad de arginina presente en la célula hospedera y la capacidad de adquirir arginina por parte del hospedero como del patógeno pueden jugar un rol importante en la evolución de la infección (Mori and Gotoh, 2004). Das y colaboradores revelaron un mecanismo por el cual *Salmonella* infectando macrófagos murinos primarios recluta transportadores de arginina del hospedador hacia la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV) y además sobre-expresa su propio transportador ArgT, a través del cual adquiere la arginina del hospedador. De esta manera limita la disponibilidad de este aminoácido para las iNOS y adquiere arginina para su propia síntesis proteica, sin costo energético extra (Das *et al.*, 2010).

Para evaluar la hipótesis que planteamos en la introducción, de que las proteínas ArtI y ArtJ contribuyen a una mayor supervivencia de *Salmonella* en el fagosoma debido a una menor actividad de iNOS, a través del transporte de arginina del hospedador hacia el interior de la bacteria limitando así su disponibilidad para esta enzima, analizamos la supervivencia intra-

macrófagos murinos (línea celular J774A.1) de los mutantes nulos *artI* y no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los mutantes y las respectivas cepas salvajes en ninguno de los dos serovares (figuras 23 y 24). Por lo tanto esta hipótesis no se confirma, aunque para descartarla o corroborarla nos planteamos como perspectiva realizar este mismo experimento utilizando macrófagos murinos primarios derivados de médula ósea, los cuales son un modelo más similar a lo que ocurre realmente dentro del hospedador. Además, nos planteamos cuantificar la producción de NO en estas células infectadas con las cepas salvajes o los mutantes *artI*.

Sin embargo *in vivo* el mutante nulo *artI* resultó atenuado en su capacidad de invadir órganos internos de ratones en *S. Dublin*, mientras que no hubo diferencias entre mutante y salvaje en *S. Enteritidis*. Se analizó también la invasividad del mutante nulo *artI* en *S. Dublin* en el modelo murino y está atenuado con respecto a la cepa salvaje (Datos no mostrados). Estos resultados sugieren nuevamente que la función de estas proteínas es importante para la virulencia del serovar Dublin, pero es dispensable para Enteritidis. Dado que, en principio no se vió efecto de la inactivación de *artI* en la capacidad de sobrevivir en el interior de macrófagos murinos en cultivo, la causa de la atenuación de este mutante en el serovar Dublin *in vivo* queda por elucidar.

En otro trabajo interesante Mills y colaboradores estudiando posibles reguladores de la concentración intracelular de c-di-GMPC (segundo mensajero bacteriano que transduce señales internas y externas), revelaron que en *S. Typhimurium* la L-arginina del medio induce un incremento en la concentración de c-di-GMP y en la síntesis de celulosa (componente de la matriz extracelular de biofilms ambientales y asociados a hospedero) dependiente de este compuesto. Además encontraron que esta señalización por L-arginina requiere de la proteína ArtI, aunque no se conoce el mecanismo (Mills *et al.*, 2015). Múltiples vías de señalización modulan la concentración de c-di-GMP para regular comportamientos bacterianos asociados con la movilidad y la síntesis de carbohidratos extracelulares que contribuyen a la formación de biofilms. Podríamos hipotetizar que la sobre-expresión de ArtI en el serotipo Dublin resulte en una mayor capacidad de formar biofilms por parte de este serotipo. Sin embargo, esto no explicaría la mayor invasividad del serotipo Dublin ya que la bibliografía apunta a que la formación de biofilm está asociada a una buena capacidad de colonizar y multiplicarse dentro del intestino de múltiples especies de hospederos y generalmente las cepas capaces de producirlo causan gastroenteritis localizada en humanos. Además, hay serotipos invasivos de *Salmonella* como *S. Typhi* que son incapaces de formar biofilms (Ahmad *et al.*, 2011; Mackenzie *et al.*, 2017).

En otro trabajo en el que estudian la inducción de genes en un aislamiento extraintestinal de *Escherichia coli*, encontraron que uno de los genes que se encuentra sobre-expresado en presencia de orina en comparación con medio LB, es *artJ*. También vieron que este gen se induce en presencia de sangre humana y fluido ascítico (Russo, Carlino and Mong, 1999).

En resumen, nuestros resultados apuntan a diferencias en el rol de los posibles transportadores de arginina ArtI y ArtJ en la virulencia de los serovares Dublin y Enteritidis, así como en su mecanismo de regulación de la expresión génica, dado que la inactivación del gen *artI* condujo a la inducción de *artJ* en *S. Dublin* pero no en *S. Enteritidis*.

## Capítulo 5.- Conclusiones y Perspectivas

**Algunos resultados sugieren que *S. Dublin* está mejor preparada para afrontar las condiciones de estrés que deberá superar durante la infección de los distintos tejidos del hospedero, lo cual podría explicar su fenotipo invasivo**

1- *S. Dublin*, el serovar más invasivo, produce altos niveles de proteínas relacionadas a la respuesta a estrés, comparado con *S. Enteritidis*.

2- *S. Dublin* resiste mejor al estrés oxidativo por presencia de peróxido de hidrógeno que *S. Enteritidis*.

3- Los niveles de ARNm en condiciones GMC de los genes *dps*, *yciF*, *yciE*, *katN*, *ygaU* y *osmY* (regulados por RpoS) son superiores que en condiciones óptimas de crecimiento y este aumento es significativamente mayor en *S. Dublin* que en *S. Enteritidis*.

### **YgaU, Dps e YciF contribuyen al fenotipo invasivo en *Salmonella***

1) YgaU sin función conocida en *Salmonella*, cumple un rol en la invasividad de *S. Dublin* y *S. Enteritidis*, ya que su inactivación provoca un fenotipo atenuado en la invasividad en ambos serotipos.

2) Dps está involucrado en la resistencia a estrés oxidativo en ambos serotipos

3) La anulación simple de *dps* afecta al serotipo *Enteritidis* no así a *Dublin* en el modelo murino. (Este fenotipo se podría asociar a la mejor supervivencia al estrés oxidativo presente en macrófagos permitiendo diseminación a órganos internos).

Hipótesis: en *Dublin* existen otras proteínas con redundancia de funciones

4) La inactivación de *yciF* (de función desconocida también) no afectó la colonización de órganos internos de ratones en ninguno de los dos serotipos, aunque el doble mutante *dps-/yciF-* resultó atenuado en ambos serotipos, sugiriendo un posible efecto sinérgico entre ambas proteínas.

### **ArtI desempeña un rol importante en la capacidad invasiva de *S. Dublin in vivo*, pero no de *S. Enteritidis***

1) El mutante nulo *artI* resultó significativamente atenuado respecto a la cepa salvaje en el modelo murino para el caso del serovar *Dublin*

2) Los niveles de ARNm *ArtI* y *ArtJ* son significativamente superiores en el serovar *Dublin* que en *Enteritidis*

3) La inactivación de *artI* en *S. Dublin* induce una sobreexpresión de *artJ* sugiriendo que ambos genes tienen función redundante o complementaria.

**Los mutantes *artI* no se encuentran afectados en su capacidad de internalización o sobrevivencia en macrófagos, por lo tanto no logramos corroborar un rol en la resistencia a los mecanismos bactericidas de los fagocitos.**

## Perspectivas

- 1) Corroborar el rol de las proteínas de interés mediante complementación de los mutantes con los genes en trans.
- 2) Evaluar los mutantes nulos en su capacidad para sobrevivir en macrófagos murinos primarios (tanto para ArtI como para Dps, YgaU e YciF).
- 3) Evaluar el fenotipo de los mutantes *dps*, *yciF* e *ygaU* en diferentes condiciones de estrés oxidativo, osmótico y ácido así como también mutantes dobles y triple
- 4) Comparar invasividad de dobles y simples mutantes en ensayos de competencia en el modelo murino.
- 5) Evaluar si los mutantes *ygaU* tienen alteraciones en la estructura del peptidoglicano.
- 6) Construir mutantes nulos en otras proteínas identificadas en este trabajo potencialmente interesantes como son *LpxR*, *Eno* y *FimA* y evaluarlos en la virulencia de *S. Dublin* y *S. Enteritidis*.
- 7) Evaluar el efecto de la anulación del gen *arcC* (último paso de la vía ADI de degradación de arginina) en la capacidad de colonizar el intestino de animales infectados.
- 8) Evaluar el doble mutante *artI/artJ* tanto en el modelo murino de salmonelosis como *in vitro* en macrófagos murinos primarios y cuantificar la producción de óxido nítrico en estas células infectadas

## Referencias Bibliográficas.

- Ahmad, I. *et al.* (2011) 'Complex c-di-GMP Signaling Networks Mediate Transition between Virulence Properties and Biofilm Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium', 6(12). doi: 10.1371/journal.pone.0028351.
- Al-Emran, H. M. *et al.* (2016) 'Validation and Identification of Invasive *Salmonella* Serotypes in Sub-Saharan Africa by Multiplex Polymerase Chain Reaction', *Clinical Infectious Diseases*, 62(Suppl 1), pp. s80–s82. doi: 10.1093/cid/civ782.
- Almiron, M. *et al.* (1992) 'A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*', *Genes and Development*, 6(12 B), pp. 2646–2654. doi: 10.1101/gad.6.12b.2646.
- Ansong, C. *et al.* (2013) 'Top-down proteomics reveals a unique protein S-thiolation switch in *Salmonella* Typhimurium in response to infection-like conditions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), pp. 10153–10158. doi: 10.1073/pnas.1221210110.
- Antillón, M. *et al.* (2017) 'The burden of typhoid fever in low- and middle-income countries: A meta-regression approach', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pntd.0005376.
- Ao, T. T. *et al.* (2015) 'Global burden of invasive nontyphoidal salmonella disease, 2010', *Emerging Infectious Diseases*, 21(6), pp. 941–949. doi: 10.3201/eid2106.140999.
- Ashraf, K. U. *et al.* (2016) 'The Potassium Binding Protein Kbp Is a Cytoplasmic Potassium Sensor', *Structure*. Elsevier Ltd, 24(5), pp. 741–749. doi: 10.1016/j.str.2016.03.017.
- Bae, B. *et al.* (2015) 'Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex', *eLifesciences*, 4(September 2015), pp. 1–23. doi: 10.7554/eLife.08504.
- Baron, F. *et al.* (2016) 'Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 53, pp. 82–93. doi: 10.1016/j.fm.2015.09.009.
- Barthel, M. *et al.* (2003) 'Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host', *Infection and Immunity*, 71(5), pp. 2839–2858. doi: 10.1128/IAI.71.5.2839-2858.2003.
- Battesti, A., Majdalani, N. and Gottesman, S. (2011) 'The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*', *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp. 189–213. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- Bäumler, A. J. *et al.* (1998) 'Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*', *Infection and Immunity*, 66(10), pp. 4579–4587.
- Becker, D. *et al.* (2006) 'Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new

antimicrobials', *Nature*, 440(7082), pp. 303–307. doi: 10.1038/nature04616.

Behravesh, C. B. *et al.* (2011) 'Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2005', *Journal of Infectious Diseases*, 204(2), pp. 263–267. doi: 10.1093/infdis/jir263.

Beraud, M. *et al.* (2010) 'A proteomic analysis reveals differential regulation of the  $\sigma$ (S)-dependent *yciGFE(katN)* locus by YncC and H-NS in *Salmonella* and *Escherichia coli* K-12.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(12), pp. 2601–16. doi: 10.1074/mcp.M110.002493.

Bernal-Cabas, M., Ayala, J. A. and Raivio, T. L. (2015) 'The Cpx envelope stress response modifies peptidoglycan cross-linking via the L,D-transpeptidase LdtD and the novel protein YgaU', *Journal of Bacteriology*, 197(3), pp. 603–614. doi: 10.1128/JB.02449-14.

Betancor, L. *et al.* (2012) 'Genomic Comparison of the Closely Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin', *The Open Microbiology Journal*, 6(1), pp. 5–13. doi: 10.2174/1874285801206010005.

Brown, R. N. *et al.* (2012) 'A Comprehensive Subcellular Proteomic Survey of *Salmonella* Grown under Phagosome-Mimicking versus Standard Laboratory Conditions', *International Journal of Proteomics*, 2012, pp. 1–12. doi: 10.1155/2012/123076.

Buckle, G. C., Walker, C. L. F. and Black, R. E. (2012) 'Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010.', *Journal of global health*, 2(1), p. 010401. doi: 10.7189/jogh.02.010401.

Calhoun, L. N. *et al.* (2010) 'Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis following propionate adaptation'.

Calhoun, L. N. and Kwon, Y. M. (2011) 'The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics', *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V., 37(3), pp. 261–265. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.034.

Chan, K. *et al.* (2003) 'Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray', 185(2), pp. 553–563. doi: 10.1128/JB.185.2.553.

Chao, T. C. and Hansmeier, N. (2012) 'The current state of microbial proteomics: Where we are and where we want to go', *Proteomics*, 12(4–5), pp. 638–650. doi: 10.1002/pmic.201100381.

Chaudhuri, R. R. *et al.* (2009) 'Comprehensive identification of *Salmonella enterica* serovar typhimurium genes required for infection of BALB/c mice', *PLoS Pathogens*, 5(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1000529.

Chauhan, D. S. *et al.* (2012) 'Molecular modelling, docking and interaction studies of human-plasmodium and salmonella-enolase with enolase inhibitors', *Bioinformatics*, 8(4), pp. 185–188.



doi: 10.6026/97320630008185.

Chen, H. *et al.* (1994) 'Determination of the optimal aligned spacing between the shine - dalgarno sequence and the translation initiation codon of escherichia coli m RNAs', *Nucleic Acids Research*, 22(23), pp. 4953–4957. doi: 10.1093/nar/22.23.4953.

Cho, Y. *et al.* (2014) 'An immunoproteomic approach for characterization of the outer membrane proteins of Salmonella Gallinarum', *Electrophoresis*, 35(6), pp. 888–894. doi: 10.1002/elps.201300199.

Cho, Y. *et al.* (2015) 'Proteomic analysis of outer membrane proteins in Salmonella enterica Enteritidis', *J Microbiol Biotechnol*, 25(2), pp. 288–295. doi: 10.1016/j.fm.2014.09.012.

Choi, Y. *et al.* (2012) 'Expression of stm4467-encoded arginine deiminase controlled by the stm4463 regulator contributes to salmonella enterica serovar typhimurium virulence', *Infection and Immunity*, 80(12), pp. 4291–4297. doi: 10.1128/IAI.00880-12.

Collado-Romero, M. *et al.* (2015) 'Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into the dynamic response of porcine intestine to Salmonella Typhimurium', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(September). doi: 10.3389/fcimb.2015.00064.

Crump, J. A., Luby, S. P. and Mintz, E. D. (2004) 'The global burden of typhoid fever', *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), pp. 346–353. doi: 10.1590/S0042-96862004000500008.

Cummings, L. A. *et al.* (2006) 'In vivo, fliC expression by Salmonella enterica serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted', *Molecular Microbiology*, 61(3), pp. 795–809. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05271.x.

Cunin, R. *et al.* (1986) 'Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria.', *Microbiological reviews*, 50(3), pp. 314–352.

Das, P. *et al.* (2010) 'Cationic Amino Acid Transporters and Salmonella Typhimurium ArgT Collectively Regulate Arginine Availability towards Intracellular Salmonella Growth', *PLoS ONE*, 5(12). doi: 10.1371/journal.pone.0015466.

Datsenko KA and Wanner BL (2000) 'One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using {PCR} products.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.

Dione, M. M. *et al.* (2011) 'Clonal differences between non-typhoidal Salmonella (NTS) recovered from children and animals living in close contact in the Gambia', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pntd.0001148.

Dong, T. and Schellhorn, H. E. (2010) 'Role of RpoS in virulence of pathogens', *Infection and Immunity*, 78(3), pp. 887–897. doi: 10.1128/IAI.00882-09.

Dyballa, N. and Metzger, S. (2009) 'Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels', *Journal of Visualized Experiments*, (30), pp. 2–5. doi:

10.3791/1431.

Encheva, V. *et al.* (2007) 'Protein expression diversity amongst serovars of *Salmonella enterica*', *Microbiology*, 153(12), pp. 4183–4193. doi: 10.1099/mic.0.2007/010140-0.

Fanghänel, J. and Fischer, G. (2004) 'Cis/trans', *Frontiers in Bioscience* 9, 9, pp. 3453–3478.

Feasey, N. A. *et al.* (2016) 'Distinct *Salmonella* Enteritidis lineages associated with enterocolitis in high-income settings and invasive disease in low-income settings', *Nature Genetics*, 48(10), pp. 1211–1217. doi: 10.1038/ng.3644.Distinct.

Feng, Y. *et al.* (2013) 'Genomic Comparison between *Salmonella Gallinarum* and *Pullorum*: Differential Pseudogene Formation under Common Host Restriction', *PLoS ONE*, 8(3), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0059427.

Fernandes, S. a *et al.* (2006) 'Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003.', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(4), pp. 179–184. doi: 10.1590/S0036-46652006000400001.

Freitas Neto, O. de *et al.* (2010) 'Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review', *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 12(1), pp. 01-11. doi: 10.1590/S1516-635X2010000100001.

Gal-Mor, O., Boyle, E. C. and Grassl, G. A. (2014) 'Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ', *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00391.

García, V. *et al.* (2018) 'Salmonella enterica serovars typhimurium and enteritidis causing mixed infections in febrile children in Mozambique', *Infection and Drug Resistance*, 11, pp. 195–204. doi: 10.2147/IDR.S147243.

Geerse, R. H., Izzo, F. and Postma, P. W. (1989) 'The PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*: FPr combines Enzyme III Fru and pseudo-HPr activities', *MGG Molecular & General Genetics*, 216(2–3), pp. 517–525. doi: 10.1007/BF00334399.

Gong, M. *et al.* (2010) 'Helicobacter pylori  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 139(2), pp. 564–573. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.050.

Gregorich, Z. R., Chang, Y. H. and Ge, Y. (2014) 'Proteomics in heart failure: Top-down or bottom-up?', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(6), pp. 1199–1209. doi: 10.1007/s00424-014-1471-9.

Gruber, T. M. and Gross, C. A. (2003) 'Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space', *Annual Review of Microbiology*, 57(1), pp. 441–466. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090913.

Guan, J., Grenier, C. and Brooks, B. W. (2006) 'In vitro study of *Salmonella enteritidis* and

Salmonella typhimurium definitive type 104: Survival in egg albumen and penetration through the vitelline membrane', *Poultry Science*, 85(9), pp. 1678–1681. doi: 10.1093/ps/85.9.1678.

Guard-Petter, J. (2001) 'The chicken, the egg and Salmonella enteritidis', *Environmental microbiology*, 3(7), pp. 421–430. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00213.x.

Halsey, T. a *et al.* (2004) 'The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for Salmonella enterica Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence', *Infection and immunity*, 72(2), pp. 1155–1158. doi: 10.1128/IAI.72.2.1155.

Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008) 'Salmonellae interplay with host cells', *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), pp. 53–66. doi: 10.1038/nrmicro1788.

Hébrard, M. *et al.* (2009) 'Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to Salmonella virulence and oxidative stress resistance', *Journal of Bacteriology*, 191(14), pp. 4605–4614. doi: 10.1128/JB.00144-09.

Henderson, B. and Martin, A. (2011) 'Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease', *Infection and Immunity*, 79(9), pp. 3476–3491. doi: 10.1128/IAI.00179-11.

Hendriksen, R. S. *et al.* (2011) 'Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007', *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(8), pp. 887–900. doi: 10.1089/fpd.2010.0787.

Hengge-Aronis, R. (2002) 'Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(3), pp. 373–95. doi: 10.1128/MMBR.66.3.373.

Hindupur, A. *et al.* (2006) 'The crystal structure of the E . coli stress protein YciF', (409), pp. 2605–2611. doi: 10.1110/ps.062307706.Protein.

Hirsch, M. and Elliott, T. (2005) 'Fis Regulates Transcriptional Induction of RpoS in Salmonella enterica Fis Regulates Transcriptional Induction of RpoS in Salmonella enterica', *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1568–1580. doi: 10.1128/JB.187.5.1568.

Holt, K. E. *et al.* (2009) 'Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of Salmonella enterica serovars Paratyphi A and Typhi', *BMC Genomics*, 10, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2164-10-36.

Huang, J. (2016) 'Infection with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture independent diagnostic tests on surveillance - foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites,2012-2015.', *Morbidity and Mortality Weekly Report*.

Ibanez-Ruiz, M. *et al.* (2000) 'Identification of RpoS (sigma(S))-regulated genes in Salmonella enterica serovar typhimurium.', *Journal of bacteriology*, 182(20), pp. 5749–5756. doi:

10.1128/JB.182.20.5749-5756.2000.Updated.

Ilari, A. *et al.* (2002) 'Iron incorporation into Escherichia coli Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core', *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp. 37619–37623. doi: 10.1074/jbc.M206186200.

Ilyas, B., Tsai, C. N. and Coombes, B. K. (2017) 'Evolution of Salmonella-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(September). doi: 10.3389/fcimb.2017.00428.

Jackson, B. R. *et al.* (2013) 'Salmonella enterica Serotypes and Food Commodities', *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), pp. 1239–1244. doi: 10.3201/eid1908.121511.

Jones, T. F. *et al.* (2008) 'Salmonellosis Outcomes Differ Substantially by Serotype', *The Journal of Infectious Diseases*, 198(1), pp. 109–114. doi: 10.1086/588823.

de Jong, H. K. *et al.* (2012) 'Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis', *PLoS Pathogens*, 8(10), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.ppat.1002933.

Kamaladevi, A., Marudhupandiyam, S. and Balamurugan, K. (2017) 'Model system based proteomics to understand the host response during bacterial infections', *Molecular BioSystems*, 13(12), pp. 2489–2497. doi: 10.1039/c7mb00372b.

Kapitein, N. and Mogk, A. (2013) 'Deadly syringes: Type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 16(1), pp. 52–58. doi: 10.1016/j.mib.2012.11.009.

Kawano, M., Manabe, T. and Kawasaki, K. (2010) 'Salmonella enterica serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(1), pp. 207–212. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.062.

Kawasaki, K. *et al.* (2012) 'Lipid A 3'-O-deacylation by Salmonella outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 428(3), pp. 343–347. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.054.

Keestra-Gounder, A. M., Tsolis, R. M. and Bäuml, A. J. (2015) 'Now you see me, now you don't: the interaction of Salmonella with innate immune receptors', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(4), pp. 206–216. doi: 10.1038/nrmicro3428.

Kingsley, R. A. *et al.* (2009) 'Epidemic multiple drug resistant Salmonella Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype', *Genome Research*, 19(12), pp. 2279–2287. doi: 10.1101/gr.091017.109.

Kirk, M. D. *et al.* (2015) 'World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data

Synthesis', *PLoS Medicine*, 12(12), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pmed.1001921.

Kuzminska-Bajor, M., Grzymajlo, K. and Ugorski, M. (2015) 'Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by *Salmonella* Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during *Salmonella* invasion', *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00276.

Kvint, K., Farewell, A. and Nyström, T. (2000) 'RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of  $\sigma(s)$ ', *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), pp. 14795–14798. doi: 10.1074/jbc.C000128200.

Lago, M. *et al.* (2017) 'Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/ $\sigma$ S in *Salmonella*: Identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-017-02362-3.

Lambert, M. A. and Smith, S. G. J. (2008) 'The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin', *BMC Microbiology*, 8, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2180-8-142.

Langridge, G. C. *et al.* (2015) 'Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), pp. 863–868. doi: 10.1073/pnas.1416707112.

Langridge, G. C., Wain, J. and Nair, S. (2012) 'Invasive Salmonellosis in Humans', *EcoSal Plus*, 5(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.6.2.2.

Lawhon, S. D. *et al.* (2002) 'Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA / SirA', *Molecular microbiology*, 46, pp. 1451–1464. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x.

Lévi-Meyrueis, C. *et al.* (2014) 'Expanding the RpoS/ $\sigma$ S-network by RNA sequencing and identification of  $\sigma$ S-controlled small RNAs in *Salmonella*', *PLoS ONE*, 9(5), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0096918.

Liu, H. *et al.* (2015) 'Decrease of colonization in the chicks' cecum and internal organs of *Salmonella enterica* serovar Pullorum by deletion of cpdB by Red system', *Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd, 80, pp. 21–26. doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.002.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lopez, M. F. *et al.* (2000) 'A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling', *Electrophoresis*, 21(17), pp. 3673–3683. doi: 10.1002/1522-2683(200011)21:17<3673::AID-ELPS3673>3.0.CO;2-M.

- Lowenstein, C. J. (2004) 'iNOS (NOS2) at a glance', *Journal of Cell Science*, 117(14), pp. 2865–2867. doi: 10.1242/jcs.01166.
- Mackenzie, K. D. *et al.* (2017) 'Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species', 4(August), pp. 1–19. doi: 10.3389/fvets.2017.00138.
- Marder, E. P. *et al.* (2017) 'Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016', *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66(15), pp. 397–403. doi: 10.15585/mmwr.mm6615a1.
- Masip, L., Veeravalli, K. and Georgiou, G. (2006) 'The Many Faces of Glutathione in Bacteria', *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 8(5 y 6), pp. 753–762. doi: 10.1089/ars.2007.1634.
- Matthews, T. D. *et al.* (2015) 'Genomic comparison of the closely-related Salmonella enterica serovars Enteritidis, Dublin and Gallinarum', *PLoS ONE*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0126883.
- Mills, E. *et al.* (2015) 'A direct screen for c-di-GMP modulators reveals a Salmonella Typhimurium periplasmic L-arginine-sensing pathway', *Science Signaling*, 8(380), pp. 1–12. doi: 10.1126/scisignal.aaa1796.
- Mohammed, M. *et al.* (2016) 'Whole genome sequencing provides an unambiguous link between Salmonella Dublin outbreak strain and a historical isolate', *Epidemiology and Infection*, 144(3), pp. 576–581. doi: 10.1017/S0950268815001636.
- Mohammed, M. *et al.* (2017) 'The invasome of Salmonella Dublin as revealed by whole genome sequencing', *BMC Infectious Diseases*. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12879-017-2628-x.
- Mori, M. and Gotoh, T. (2004) 'Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection', *the journal of nutrition*, 134(10), p. 2820S–2825S; discussion 2853S. doi: 134/10/2820S [pii].
- Nair, S. and Finkel, S. E. (2004) 'Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase', *J Bacteriol*, 186(13), pp. 4192–8. doi: 10.1128/JB.186.13.4192.
- Nickerson, K. P. *et al.* (2018) 'Salmonella Typhi Colonization Provokes Extensive Transcriptional Changes Aimed at Evading Host Mucosal Immune Defense During Early Infection of Human Intestinal Tissue', *EBioMedicine*. The Authors, 31, pp. 92–109. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.04.005.
- Nuccio, S. P. and Bäumlner, A. J. (2014) 'Comparative analysis of Salmonella genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut', *mBio*, 5(2), pp. 1–8. doi:

10.1128/mBio.00929-14.

Okoro, C. K. *et al.* (2012) 'Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa', *Nature Genetics*, 44(11), pp. 1215–1221. doi: 10.1038/ng.2423.

Okoro, C. K. *et al.* (2015) 'Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pntd.0003611.

Pancholi, V., Fontan, P. and Jin, H. (2003) 'Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells', *Microbial Pathogenesis*, 35(6), pp. 293–303. doi: 10.1016/j.micpath.2003.08.004.

Pérez-Llarena, F. J. and Bou, G. (2016) 'Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance', *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp. 1–21. doi: 10.3389/fmicb.2016.00410.

Prouty, A. M. *et al.* (2004) 'Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*', *Microbiology*, 150(4), pp. 775–783. doi: 10.1099/mic.0.26769-0.

Raffatellu, M. *et al.* (2008) 'Clinical pathogenesis of typhoid fever.', *Journal of infection in developing countries*, 2(4), pp. 260–266. doi: 10.3855/jidc.219.

Robbe-saule, Â. and Coynault, C. (2001) 'Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (  $\sigma^S$  )', 39.

Robbe-Saule, V. *et al.* (2001) 'Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS ( $\sigma^S$ ).', *Mol. Microbiol.*, 39, pp. 1533–1545.

Rodland, K. D. *et al.* (2008) 'Use of high-throughput mass spectrometry to elucidate host-pathogen interactions in *Salmonella*', *Future Microbiology*, 3(6), pp. 625–634. doi: 10.2217/17460913.3.6.625.

Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V. and Rowe, B. (1990) 'International increase in *Salmonella* enteritidis: A new pandemic?', *Epidemiology and Infection*, 105(1), pp. 21–27. doi: 10.1017/S0950268800047609.

Rodríguez, I. *et al.* (2012) 'Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis', *Emerging Infectious Diseases*, 18(7), pp. 1173–1176. doi: 10.3201/eid1807.120063.

Rosenkrantz, J. T. *et al.* (2013) 'Non-essential genes form the hubs of genome scale protein function and environmental gene expression networks in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium', *BMC Microbiology*, 13(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/1471-2180-13-294.

Russo, T. A., Carlino, U. B. and Mong, A. (1999) 'Identification of Genes in an Extraintestinal Isolate of *Escherichia coli* with Increased Expression after Exposure to Human Urine', 67(10),

pp. 5306–5314.

Rychlik, I. and Barrow, P. A. (2005) 'Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp. 1021–1040. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.005.

Saini, S., Pearl, J. A. and Rao, C. V. (2009) 'Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type I fimbriae in salmonella enterica serovar typhimurium', *Journal of Bacteriology*, 191(9), pp. 3003–3010. doi: 10.1128/JB.01694-08.

Sasías, S. *et al.* (2017) 'A naturally occurring deletion in FliE from Salmonella enterica serovar Dublin results in an aflagellate phenotype and defective proinflammatory properties', *Infection and Immunity*, 86(1). doi: 10.1128/IAI.00517-17.

Schmees, C. *et al.* (2007) 'Inhibition of T-Cell Proliferation by Helicobacter pylori  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase', *Gastroenterology*, 132(5), pp. 1820–1833. doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.031.

Selander, R. K. *et al.* (1990) 'Evolutionary genetic relationships of clones of Salmonella serovars that cause human typhoid and other enteric fevers', *Infection and Immunity*, 58(7), pp. 2262–2275.

Shah, D. H. *et al.* (2012) 'Transposon mutagenesis of Salmonella enterica serovar enteritidis identifies genes that contribute to invasiveness in human and chicken cells and survival in egg albumen', *Infection and Immunity*, 80(12), pp. 4203–4215. doi: 10.1128/IAI.00790-12.

Shah, D. H. (2014) 'RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of Salmonella enterica serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), pp. 896–906. doi: 10.1128/AEM.02740-13.

Sonck, K. A. J. *et al.* (2009) 'The proteome of Salmonella Typhimurium grown under in vivo-mimicking conditions', *Proteomics*, 9(3), pp. 565–579. doi: 10.1002/pmic.200700476.

Song, M. *et al.* (2014) 'Low molecular weight thiol-dependent antioxidant and antinitrosative defenses in Salmonella pathogenesis', *Mol Microbiol*, 87(3), pp. 1–26. doi: 10.1111/mmi.12119.Low.

Theeya, N. *et al.* (2015) 'An inducible and secreted eukaryote-like serine/threonine kinase of Salmonella enterica serovar typhi promotes intracellular survival and pathogenesis', *Infection and Immunity*, 83(2), pp. 522–533. doi: 10.1128/IAI.02521-14.

Thomson, N. R. *et al.* (2008) 'Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287 / 91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways', *Genome Research*, 18, pp. 1624–1637. doi: 10.1101/gr.077404.108.1.

Threlfall, E. J., Hall, M. L. M. and Rowe, B. (1992) 'Salmonella bacteraemia in England and Wales, 1981-1990', *Journal of Clinical Pathology*, 45(1), pp. 34–36. doi: 10.1136/jcp.45.1.34.

Uzzau, S. *et al.* (2000) 'Host adapted serotypes of Salmonella enterica', *Epidemiology and*



*Infection*, 125(2), pp. 229–255. doi: 10.1017/S0950268899004379.

Valdes, K. M. *et al.* (2016) 'The fruRBA operon is necessary for group A streptococcal growth in fructose and for resistance to neutrophil killing during growth in whole human blood', *Infection and Immunity*, 84(4), pp. 1016–1031. doi: 10.1128/IAI.01296-15.

Wang, Y., Huang, K. Y. and Huo, Y. (2014) 'Proteomic comparison between *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Typhi', *Journal of Microbiology*, 52(1), pp. 71–76. doi: 10.1007/s12275-014-3204-3.

Wangdi, T., Winter, S. E. and Bäumlner, A. J. (2012) "' You can ' t hit what you can ' t see " © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute .', 3(2), pp. 88–92.

Weber, A., Kögl, S. A. and Jung, K. (2006) 'Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 188(20), pp. 7165–7175. doi: 10.1128/JB.00508-06.

Winter, S. E. *et al.* (2010) 'A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of salmonella', *PLoS Pathogens*, 6(8), pp. 63–64. doi: 10.1371/journal.ppat.1001060.

Winter, S. E. *et al.* (2010) 'The Blessings and Curses of intestinal inflammation', *Cell Host and Microbe*, 8(1), pp. 36–43. doi: 10.1016/j.chom.2010.06.003.The.

Wissenbach, U. *et al.* (1995) 'A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the artPIQMJ genes, arginine binding and transport', *Molecular Microbiology*, 17(4), pp. 675–686. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_17040675.x.

Wolf, S. G. *et al.* (1999) 'DNA protection by stress-induced biocrystallization', *Nature*, 400(6739), pp. 83–85. doi: 10.1038/21918.

Wright, J. A. *et al.* (2009) 'Multiple redundant stress resistance mechanisms are induced in *Salmonella enterica* serovar typhimurium in response to alteration of the intracellular environment via TLR4 signalling', *Microbiology*, 155(9), pp. 2919–2929. doi: 10.1099/mic.0.030429-0.

Xiong, L. *et al.* (2016) 'Arginine Metabolism in Bacterial Pathogenesis and Cancer Therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), p. 363. doi: 10.3390/ijms17030363.

Yim, H. H., Brems, R. L. and Villarejo, M. (1994) 'Molecular characterization of the promoter of osmY, an rpoS-dependent gene', *Journal of Bacteriology*, 176(1), pp. 100–107. doi: 10.1128/jb.176.1.100-107.1994.

Yim, H. H. and Villarejo, M. (1992) '\textit{{osmY}}, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in \textit{{Escherichia coli}}.', *J Bacteriol*, 174(11), pp. 3637–3644. doi: 10.1128/jb.174.11.3637-3644.1992.

Yim, L. *et al.* (2014) 'Repression of flagella is a common trait in field isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin and is associated with invasive human infections', *Infection and Immunity*, 82(4), pp. 1465–1476. doi: 10.1128/IAI.01336-13.

Yue, M. *et al.* (2015) 'Allelic variation contributes to bacterial host specificity', *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms9754.

Zeiner, S. A., Dwyer, B. E. and Clegg, S. (2012) 'FimA, FimF, and FimH Are necessary for assembly of Type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium', *Infection and Immunity*, 80(9), pp. 3289–3296. doi: 10.1128/IAI.00331-12.

Zheng, X. *et al.* (2015) 'RpoS-Dependent Expression of OsmY in *Salmonella enterica* serovar Typhi: Activation Under Stationary Phase and SPI-2-Inducing Conditions', *Current Microbiology*, 70(6), pp. 877–882. doi: 10.1007/s00284-015-0802-1.

## Anexo

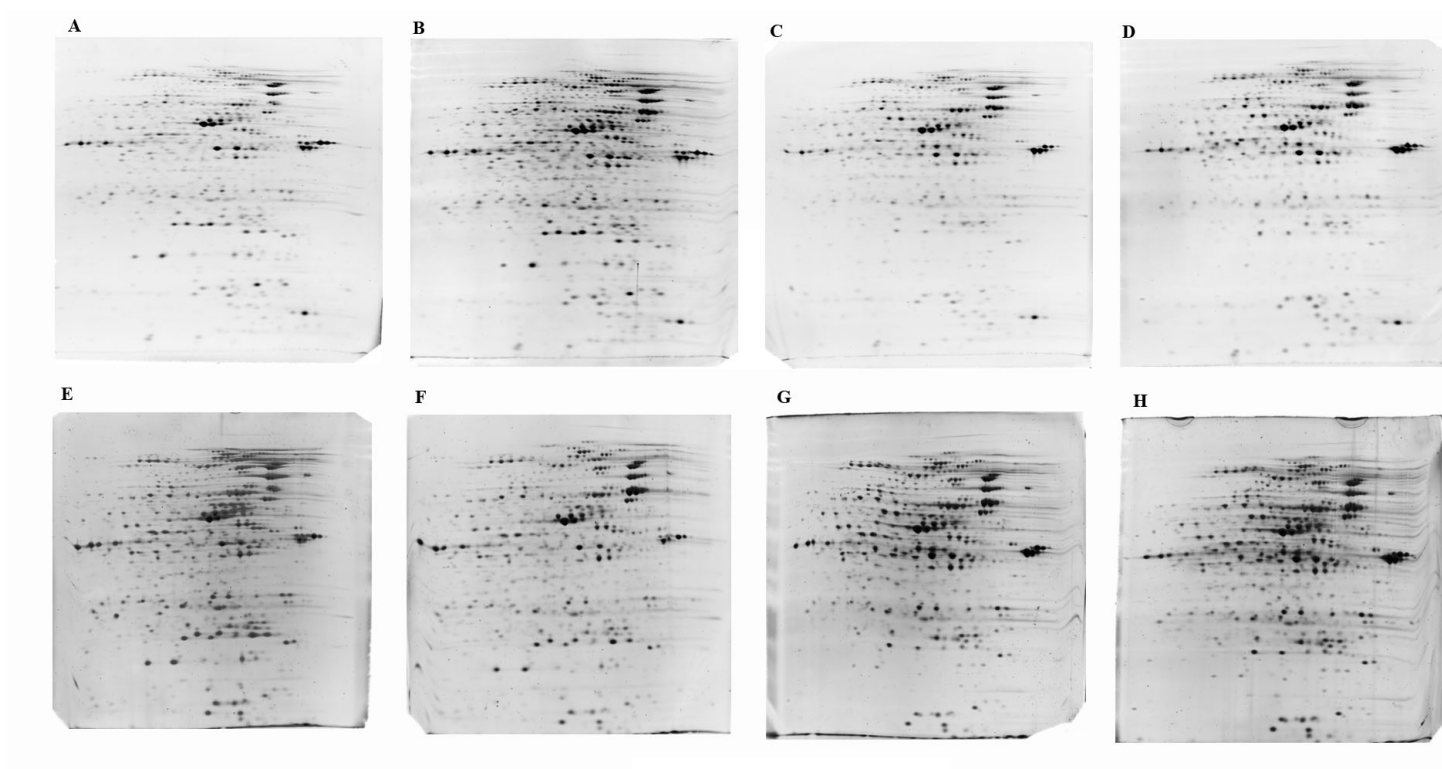


Figura S1. Electroforesis bi- dimensional de extractos proteicos totales, de los cuatro aislamientos analizados, en dos experimentos independientes. Paneles A-D (primer experimento): *S. Dublin* (SDU3 y SDU5) y *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) respectivamente. Paneles E-H (segundo experimento): *S. Dublin* (SDU3 y SDU5) y *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) respectivamente

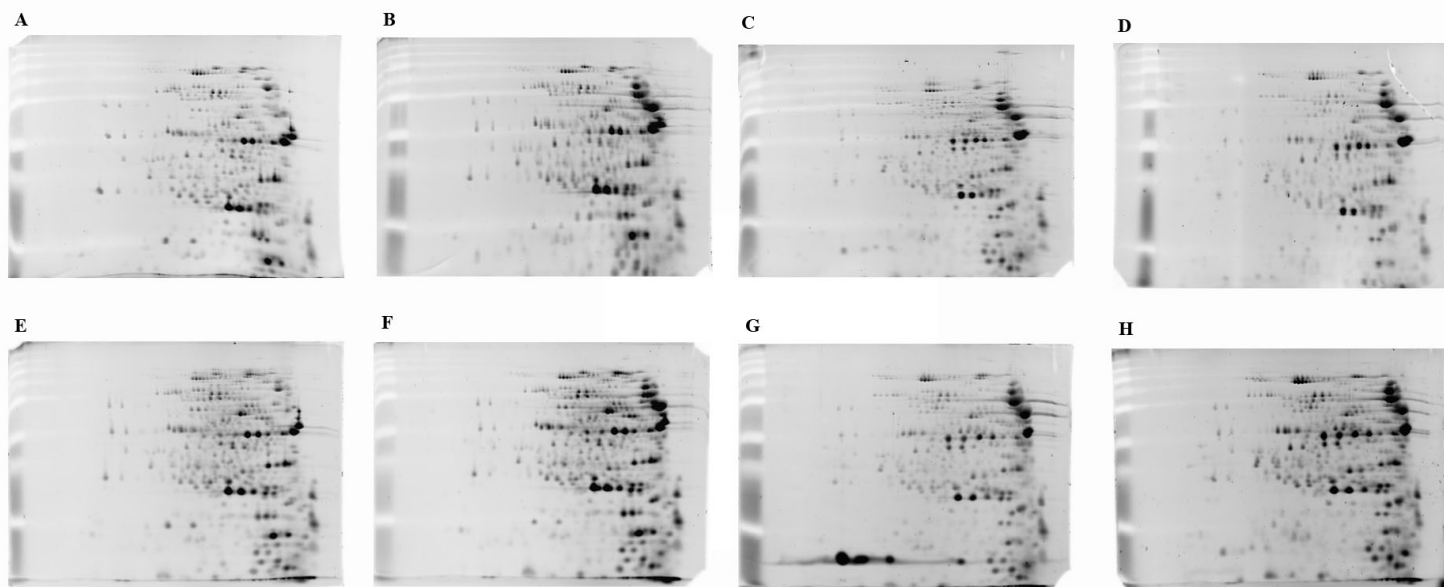


Figura S2. Electroforesis bi- dimensional de extractos proteicos de superficie, de los cuatro aislamientos analizados, en dos experimentos independientes. Paneles A-D (primer experimento): *S. Dublin* (SDU3 y SDU5) y *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) respectivamente. Paneles E-H (segundo experimento): *S. Dublin* (SDU3 y SDU5) y *S. Enteritidis* (8/02 y 251/01) respectivamente