



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Tesina para obtención del título de la Licenciatura en Bioquímica**

**Etiquetado molecular de una proteína  
relevante en la invasividad de *Salmonella*  
*enterica* y determinación de su  
localización subcelular por métodos  
inmunológicos**

**Mateo Olivero**

**Tutora: Dra. Lucía Yim**

Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene  
Septiembre 2023, Montevideo, Uruguay.

## Resumen

El género *Salmonella* es de importancia clínica ya que es uno de los principales agentes causantes de enfermedades transmitidas a través de los alimentos en todo el mundo. El control de la infección por *Salmonella* es difícil debido a la alta tolerancia de la bacteria al estrés ambiental, la resistencia a múltiples antimicrobianos, la distribución generalizada y la adaptabilidad. Las infecciones en humanos por *Salmonella* no tifoidea causan una gastroenteritis autolimitada que puede resolverse sin tratamiento después de 1 a 7 días, aunque aproximadamente el 5 % derivan en una infección sistémica (extraintestinal) con mayor morbilidad y mortalidad, que normalmente afecta a los bebés, adultos mayores y personas inmunodeprimidas.

Es así que, algunos serovares menos prevalentes de *Salmonella enterica* como *Salmonella* Dublin muestran un índice de invasividad sustancialmente más alto que otros, como *Salmonella* Enteritidis, serovar más prevalente a nivel mundial. A pesar de presentar marcadas diferencias en sus índices de invasividad, estos dos serotipos están muy estrechamente relacionados a nivel filogenético.

En estudios proteómicos comparativos entre *Salmonella* Dublin y *Salmonella* Enteritidis, realizados por el grupo de investigación en el cual desarrollé este trabajo, se ha observado que la proteína YgaU está sobreexpresada en *Salmonella* Dublin respecto a *Salmonella* Enteritidis en condiciones que imitan el intestino (GMC), es decir, alta osmolaridad, baja tensión de oxígeno y presencia de sales biliares y ácidos grasos de cadena corta. También se observó que un mutante nulo *ygaU::kan* en conjunto con la mutación *dps::cat* en *Salmonella* Dublin es significativamente menos invasivo que la cepa salvaje en el modelo murino. Se postula que esta proteína podría estar involucrada en el aumento de la virulencia y por lo tanto es de interés estudiarla.

En el presente trabajo nos propusimos determinar la localización subcelular de esta proteína en *Salmonella enterica* arrojando luz en la comprensión de su función y de su contribución en la virulencia. Para ello etiquetamos YgaU mediante fusión de su secuencia codificadora a la secuencia codificadora de 3 copias en tándem del epítipo FLAG (3xFLAG), lo que nos permitió detectarla por métodos inmunológicos. Determinamos que YgaU se localiza en la membrana de *Salmonella*. Esta construcción podría servirnos en un futuro para identificar proteínas que interactúen con YgaU mediante la técnica de inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas.

**Palabras Clave:** *Salmonella enterica*; Invasividad; YgaU; Epítipo FLAG; Inmunolocalización

## Abreviaturas

3XFLAG	3 copias en tándem del epítipo FLAG
DO	Densidad Óptica
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FC	Fracción Citoplásmica
FM	Fracción de Membrana
FP	Fracción Periplásmica
GMC	Del inglés: gut-mimicking conditions
MPM	Marcador de peso molecular
OD	Del inglés: Overday
ON	Del inglés: Overnigth (equivalente a 16-20 hs)
Rpm	Revoluciones por minuto
SDu	<i>Salmonella enterica</i> serovar Dublin
SEn	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis

# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiología de la especie <i>Salmonella enterica</i> .....	7
1.2 Taxonomía y clasificación de <i>Salmonella spp.</i> .....	8
1.3 Patogénesis.....	9
1.4 Antecedentes de YgaU: Una proteína de función desconocida en <i>Salmonella enterica</i> .....	11
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>13</b>
3.1 Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	13
3.2 Plásmidos.....	14
3.3 Cebadores.....	14
3.4 Construcción de las cepas etiquetadas <i>ygaU:FLAG</i> .....	15
3.4.1 Obtención del fragmento de ADN a insertar en el genoma.....	15
3.4.2 Preparación de células competentes y transformación.....	16
3.4.3 Verificación del etiquetado mediante PCR.....	16
3.4.4 Transducción a nuevos fondos genéticos.....	17

3.4.4.1 Preparación de los lisados sobre las cepas etiquetadas SDu5 <i>ygaU::FLAG</i> y SEn <i>ygaU::FLAG</i> .....	17
3.4.4.1 Transducción del etiquetado en cepas SDu5, SEn 83/10 y SEn 8/02.....	17
3.5 Verificación del etiquetado de YgaU mediante Western Blot de los extractos Proteicos totales.....	18
3.5.1 Preparación de extractos proteicos para western blotting.....	18
3.5.2 Western Blot de los extractos proteicos totales.....	18
3.6 Fraccionamiento subcelular.....	19
3.6.1 Western Blot de las fracciones subcelulares crecidas en Condiciones óptimas.....	19
3.6.2 Western Blot de las fracciones subcelulares crecidas en condiciones GMC.....	19
3.7 Visualización de la localización subcelular de YgaU por microscopía confocal de fluorescencia.....	19
3.8 Predicción de la estructura tridimensional de YgaU fusionada al Epítipo 3xFLAG.....	20
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>20</b>
4.1 Construcción de las cepas etiquetadas <i>ygaU::FLAG</i> .....	20
4.2 Verificación de la construcción mediante PCR.....	21
4.3 Puesta a punto para la detección de la proteína YgaU por Western Blot.....	24
4.4 Puesta a punto del fraccionamiento subcelular.....	25
4.5 Determinación de la localización subcelular de YgaU mediante Western Blot.....	25
4.6 Puesta a punto de la localización subcelular mediante microscopía	

confocal de fluorescencia..... 27

**4.7** Visualización de la localización subcelular de YgaU mediante microscopía  
confocal de Fluorescencia..... 27

**5. Conclusiones y perspectivas..... 30**

**6. Referencias..... 31**

# 1. Introducción

## 1.1 Epidemiología de la especie *Salmonella enterica*

*Salmonella* es un género bacteriano dentro de la familia *Enterobacteriaceae* constituido por bacterias de forma bacilar gramnegativas. Son organismos intracelulares facultativos con flagelos peritricos, que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Son capaces de infectar mamíferos, aves y vertebrados de sangre fría, generando un conjunto de enfermedades denominada salmonelosis que involucran a la fiebre tifoidea y la salmonelosis no tifoidea.

*Salmonella* es una de las principales causas de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en todo el mundo con un total de 154 millones de casos al año de salmonelosis no tifoidea [1] y 17.8 millones de casos al año de fiebre tifoidea en países de bajos y medianos ingresos [2]. Las ETA se producen por la ingesta de agua y/o alimentos contaminados por microorganismos y constituyen un problema grave y creciente para la salud pública por ser causa de morbilidad e impacto económico en las poblaciones. La infección humana puede ser también el resultado del contacto directo con animales infectados o sus entornos. En Estados Unidos en el año 2021 se registraron 7148 casos de salmonelosis que generó 1974 hospitalizaciones y 52 muertes según reportes de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [3]. En la Unión Europea la ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) y la EFSA (European Food Safety Authority) reportaron que el número de casos confirmados de salmonelosis en el mismo año fue de 60050 casos de los cuales 11785 derivaron en hospitalizaciones y 71 en muertes [4]. En ambos territorios, *Salmonella* fue el segundo agente causal de ETA detrás de *Campylobacter* y el primero en lo que se refiere a hospitalizaciones y muertes.

En Uruguay, *Salmonella* es el patógeno responsable del mayor número de brotes de ETA en los cuales el agente fue identificado según el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud Pública (MSP) del año 2017 realizado por la División Epidemiología de la Dirección General de Salud. En él se informa que en el año 2016 se registraron 47 brotes de ETA que afectaron a 663 personas. De los 25 brotes en los que se logró identificar el agente causal 18 correspondían a *Salmonella enterica*. Los datos más actuales son del año 2022 obtenidos al solicitar acceso a la información pública al MSP sobre brotes y casos de ETA en Uruguay. Para dicho año se informaron 13 brotes donde no se especificó la identidad del agente etiológico y 40 casos de *Salmonella spp.* en aquellos casos donde se pudo confirmar por laboratorio el microorganismo causante de la enfermedad.

La transmisión generalmente se produce por el consumo de alimentos contaminados (por ejemplo, lácteos, huevos, carne, productos crudos); beber agua contaminada; o por contacto con personas que tienen una enfermedad diarreica. El riesgo de infección después de la

exposición aumenta al tomar antibióticos o medicamentos antiácidos. Los reservorios de animales incluyen animales domésticos y salvajes, incluidos animales de alimentación, anfibios y reptiles [5].

Solo unos pocos serovares pertenecientes a la subespecie enterica son responsables de la mayoría de infecciones en humanos a nivel mundial, siendo *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* los serovares más prevalentes. Las diferencias regionales observadas entre la incidencia de infección por serovares pueden explicarse por diferencias en los huéspedes animales que pueblan la región, la calidad de los sistemas de vigilancia, las inmunodeficiencias concurrentes como la infección por el VIH o el cáncer, prácticas agrícolas o prácticas de producción de alimentos que podrían seleccionar serovares específicos, o factores ambientales que influyen en el cultivo, la supervivencia o las rutas de transmisión [6].

## 1.2 Taxonomía y clasificación de *Salmonella spp.*

El género comprende dos especies; *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* [7]. La especie *Salmonella enterica* se clasifica además en seis subespecies a las que se hace referencia con un número romano y un nombre: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) [8]. Estas especies y subespecies se distinguen sobre la base de características diferenciales, como reacciones a la lactosa, sorbitol, crecimiento en medio con KCN, entre otros [7]. La mayoría de los aislados de *Salmonella* que infectan a los huéspedes de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (I), mientras que las subespecies II a VI y *S. bongori* se aíslan principalmente de fuentes ambientales o de huéspedes de sangre fría, como reptiles y anfibios [6]. Se han descrito más de 2600 serovares de *Salmonella enterica*. El serotipado consiste en la clasificación inmunológica de dos estructuras superficiales, el polisacárido O (antígeno O) y la proteína flagelina (antígeno H) [9]. El esquema de serotipado de Kauffmann-White para la designación de los serotipos de *Salmonella*, que es utilizado por la mayoría de los laboratorios para la caracterización de los aislados de *Salmonella*, reconoce 46 serogrupos O y 114 antígenos H que, en varias combinaciones, resultan en los más de 2600 serotipos caracterizados [9].

No todos los serotipos infectan a los mismos hospederos ni generan el mismo cuadro clínico y en base a esto se pueden clasificar como 1) Tifoideos (*Salmonella* Tifoidea (ST)), que son los serotipos restringidos al humano (Typhi, Paratyphi A y Paratyphi C), que causan una enfermedad grave sistémica denominada fiebre tifoidea (si es provocado por el serotipo Typhi) o fiebre paratifoidea (si es provocado por los serotipos Paratyphi A y C). Se estima que en el mundo ocurren entre 11 y 21 millones de casos de fiebre tifoidea y 5 millones de casos de fiebre paratifoidea, causando un estimado de 135.000-230.000 muertes [10]. 2) No Tifoideos (*Salmonella* No Tifoidea (SNT)) que normalmente pueden infectar un amplio rango de hospederos y provocar una gastroenteritis autolimitada que pueden resolverse sin tratamiento después de 1 a 7 días, aunque aproximadamente en un 5% de los casos provocan una infección sistémica con mayor morbilidad y mortalidad, que afecta mayormente a los bebés, los adultos mayores y las personas inmunodeprimidas, incluidas las que tienen VIH [5].



También pueden clasificarse según el rango de hospedadores que infectan en 1) ubicuos, que infectan una gran cantidad de especies como es el caso de *S. Enteritidis*, 2) adaptados a hospedador, que infectan un número restringido de especies como *S. Dublin* (adaptado a ganado vacuno), y 3) específicos de un hospedador, que infectan una única especie como es el ejemplo de *S. Typhi*.

Mediante estudios genómicos comparativos se logró dilucidar las diferencias a nivel genético que serían responsables del rango de hospederos a infectar y el grado de virulencia, entre serovares estrechamente relacionados a nivel genético como *S. Enteritidis*, *S. Dublin* y *S. Gallinarum*. El proceso evolutivo de adaptación a hospedero parece estar impulsado primero por la adquisición de nuevos genes mediante transferencia horizontal, seguido de la pérdida de función génica debido a la acumulación de mutaciones puntuales que en última instancia resultan en la formación de pseudogenes [11][12]. Por lo tanto los serovares más específicos de un hospedador adquirieron nuevos genes mediante THG y contienen mayor cantidad de pseudogenes que los serovares ubicuos. Se ha observado también que a medida que un serovar es más específico de un hospedador genera frecuentemente enfermedades sistémicas con mayor morbilidad y mortalidad. Los pseudogenes se observan en vías metabólicas (como la capacidad de utilizar anaeróbicamente el propanodiol y la etanolamina como fuentes de carbono y energía) o en estructuras de superficie (como el LPS, las fimbrias y los flagelos). Ciertas vías metabólicas proporcionan ventaja de crecimiento en el intestino inflamado y las estructuras de superficie a menudo son antigénicas para el sistema inmune del huésped [11].

### 1.3 Patogénesis

La infección por *Salmonella* se adquiere normalmente por la ingestión oral de alimentos o aguas contaminadas, aunque también el contacto con reptiles y anfibios puede ser un factor de riesgo. Posteriormente las bacterias sobreviven al bajo pH estomacal debido a su tolerancia al pH ácido y evaden las múltiples defensas del intestino delgado para poder acceder al epitelio. Una vez aquí ingresan en células epiteliales especializadas llamadas células M que se dedican a la toma de muestras de antígenos intestinales a través de pinocitosis y las transportan a las células linfoides subyacentes en las placas de Peyer. También pueden invadir los enterocitos por un mecanismo de endocitosis mediado por la bacteria. Una vez que han atravesado la barrera epitelial, los serotipos de *Salmonella* que están asociados a enfermedad sistémica son internalizados por los macrófagos intestinales mediante fagocitosis mediada por los macrófagos y activan varios mecanismos de virulencia para sobrevivir en el entorno microbicida de la célula, lo que promueve la replicación y posterior diseminación a través del sistema reticuloendotelial. Esto conlleva a una infección sistémica o invasiva, en la cual las bacterias pueden alojarse en diversos órganos internos con la consecuente elevada morbi-mortalidad.

Por el contrario, la infección por la mayoría de serotipos no tifoideos en adultos humanos sanos generalmente se limita al intestino, donde las bacterias inducen una respuesta

inflamatoria temprana que resulta en la infiltración de leucocitos polimorfonucleares en el lumen intestinal. La liberación de gránulos citotóxicos por las células polimorfonucleares, así como las acción de varios efectores bacterianos que estimulan la respuesta inflamatoria pueden resultar en la destrucción de la mucosa intestinal, lo que contribuye a la diarrea [13][14].

Se han identificado varios mecanismos moleculares mediante los cuales *Salmonella* interactúa con las células del hospedero. Uno de ellos son los denominados Sistemas de Secreción de Tipo III (T3SS, del inglés Type III Secretion System) asociados a la virulencia, codificados en las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2 (SPI1 y SPI2 respectivamente) que funcionan en diferentes momentos durante la infección. Mientras que el T3SS codificado en la SPI1 (T3SS-1) es necesario para la invasión de células no fagocíticas, la inducción de respuestas inflamatorias intestinales y la diarrea, el T3SS codificado en la SPI2 tiene un papel importante en la supervivencia bacteriana en los macrófagos y en el establecimiento de enfermedades sistémicas [14]. Todos los serovares de *Salmonella* codifican el T3SS-1, que fue adquirido por transferencia horizontal de genes después de que el linaje de *Salmonella* divergiera del de *Escherichia coli*. El surgimiento de *S. enterica* se acompañó de la adquisición horizontal de SPI2 [15].

La microbiota intestinal, una comunidad microbiana diversa residente del intestino que se compone en gran medida de bacterias anaerobias obligatorias pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, degradan los nutrientes presentes en el intestino distal a una variedad de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato y butirato. La comunidad microbiana fecal humana consta de 160 especies aproximadamente que compiten para la adquisición de nutrientes en este entorno. Para tener éxito y alcanzar los números necesarios para la transmisión a un nuevo hospedero, *Salmonella* debe encontrar un nicho de nutrientes vacío o invadir uno de los aproximadamente 160 nichos de nutrientes habitados y superar al ocupante actual. En principio *Salmonella* no presenta ninguna ventaja obvia sobre los microorganismos residentes, pero mediante sus factores de virulencia manipula al hospedero, invadiendo la mucosa intestinal y desencadenando la inflamación para crear un nuevo nicho de nutrientes que contiene algunos sustratos con los que el patógeno puede crecer más rápido que los miembros de la microbiota. Un ejemplo de sustrato generado durante la inflamación que es aprovechado por *Salmonella* es el tetrionato que proporciona un aceptor de electrones que le permite realizar respiración anaerobia. Este sustrato se genera por la oxidación del tiosulfato por especies reactivas de oxígeno generados por la respuesta inflamatoria del hospedero. Por lo tanto, a través de este mecanismo *Salmonella* puede establecer un nicho en la luz intestinal para garantizar su transmisión por la ruta fecal-oral [15].

Queda claro que la infección es un proceso sofisticado que requiere la participación de reguladores para coordinar la expresión no solo de los genes que codifican los factores de virulencia, sino también de aquellos involucrados en otros procesos fisiológicos, como la respuesta al estrés y distintas rutas metabólicas. Durante la infección y en sus entornos naturales, las bacterias deben hacer frente a condiciones estresantes como la limitación de

diversos nutrientes, la intensa competencia por los recursos, una variedad de tensiones como la temperatura no óptima, el pH o la elevada osmolaridad, los radicales derivados del oxígeno, los iones metálicos tóxicos y la radiación, así como la depredación por bacteriófagos y otras bacterias o protozoarios.

El factor sigma alternativo RpoS (subunidad  $\sigma^s$  de la ARN polimerasa) es un regulador de respuesta clave a las condiciones de estrés, que regula genes involucrados en el metabolismo, la composición e integridad de la membrana, la regulación a la baja de las funciones de la cadena respiratoria, la formación de biopelículas y la patogénesis [16][17]. Esta combinación de estrategias permite a las bacterias contrarrestar estas condiciones potencialmente mortales. Como regulador de la transcripción, RpoS puede mediar en la virulencia, ya sea directamente controlando la expresión de los factores de virulencia o indirectamente estimulando la respuesta general de adaptación para mejorar la supervivencia de los patógenos en entornos hostiles como los encontrados dentro del hospedero. RpoS es esencial para la supervivencia en condiciones como el estrés oxidativo, el osmótico, la inanición, el daño al ADN, el bajo pH, que *Salmonella* enfrenta durante la colonización del intestino o el crecimiento intracelular en los macrófagos del hospedero.

Por lo tanto, la capacidad de adaptarse rápidamente a los entornos cambiantes es fundamental para que los patógenos bacterianos transmitan e infecten con éxito a los huéspedes [18].

#### **1.4 Antecedentes de YgaU: Una proteína de función desconocida en *Salmonella enterica***

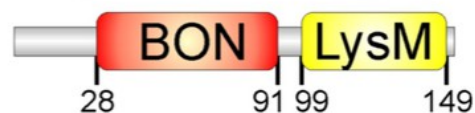
*Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Dublin son dos serovares estrechamente relacionados a nivel filogenético pero muy diferentes en el rango de hospederos y virulencia [19]. A nivel mundial *Salmonella* Enteritidis es uno de los principales serovares de *Salmonella* no tifoidea involucrados en infecciones en humanos. Sin embargo, *Salmonella* Dublin es menos prevalente y con frecuencia causa infecciones invasivas (extraintestinales) con mayor morbilidad y mortalidad.

Es así que *S. Dublin* muestra un índice de invasividad (% de aislamientos de hemocultivo del total para un determinado serovar) sustancialmente más alto que *S. Enteritidis* a nivel mundial (33% para *S. Dublin*, 1,8 % para *S. Enteritidis*) [20]. En Uruguay *S. Enteritidis* es el serovar mayormente aislado de infecciones humanas en el período 2009-2018. Sin embargo, el índice de invasividad reportado para *S. Enteritidis* para ese período en nuestro país es del 14,8%, mientras que para *S. Dublin* es de 84,6% (datos del MSP y del Centro Nacional de Salmonella, DBV, Instituto de Higiene). Los análisis genómicos comparativos revelaron pocos genes de diferencia entre los dos serovares [19], por lo que pueden existir diferencias a nivel de la expresión génica, lo que resulta en una diferencia en la abundancia de las proteínas, datos que no se revelan mediante análisis genómicos comparativos.

El perfil proteómico comparativo a gran escala de un aislado clínico de cada serovar cultivado en condiciones que imitan el ambiente intestinal (GMC del inglés gut-mimicking conditions), es decir, alta osmolaridad, baja tensión de oxígeno y presencia de sales biliares y ácidos

grasos de cadena corta, reveló que una proteína denominada YgaU se encontraba sobrerrepresentada en el serovar Dublin junto con otras proteínas involucradas en la resistencia al estrés ambiental y la virulencia [21]. Además en ese mismo trabajo se demuestra que un mutante nulo *ygaU::kan* en conjunto con la mutación *dps::cat* en *S. Dublin* es menos invasivo que la cepa salvaje en el modelo murino. En el caso de los mutantes nullos simples *dps::cat* y *ygaU::kan* no se observaron diferencias con respecto a la cepa salvaje en este modelo.

YgaU es una proteína de función desconocida que en *Salmonella* se sabe está regulada por el factor sigma alternativo RpoS [16][22][23]. Del análisis bioinformático de su secuencia se deduce que posee un dominio LysM frecuente en enzimas que interactúan con el peptidoglicano [24], y un motivo BON que se encuentra en proteínas que se unen a fosfolípidos aniónicos de la membrana [25] (figura 1). No se infiere la presencia de un péptido señal ni de fragmento transmembrana. El dominio BON fue reportado en una proteína que se cree que puede estar involucrada en procesos de biogénesis de la Membrana en *E. coli* [25]. El dominio LysM es un módulo general de unión a peptidoglicano originalmente identificado en enzimas que degradan las paredes celulares bacterianas, pero que también está presente en muchas otras proteínas.



**Figura 1.** Esquema de la proteína YgaU con sus dominios BON y LysM tomado de la figura 1a de Bryant et al., 2020.

En un estudio realizado en *Salmonella* Typhimurium donde se analizaron las respuestas transcripcionales a una serie de condiciones de crecimiento y estrés (térmico, oxidativo, osmótico y ácido) se observó que *ygaU*, el gen que codifica para la proteína YgaU, estaba inducido en todas estas condiciones [26]. En otro estudio también realizado con *Salmonella* Typhimurium donde se evaluó la aptitud relativa de miles de mutantes en pollos, cerdos y ganado bovino se observó que el mutante *ygaU* tiene una atenuación significativa en su capacidad de colonizar el intestino de los diferentes hospederos [27].

En *Escherichia coli*, se ha propuesto que el homólogo de YgaU actúa como un sensor de potasio citosólico [28] aunque también como una proteína de membrana con un dominio de unión a peptidoglicano [29]. Sin embargo su localización subcelular así como su función en *Salmonella* se desconocen. Postulamos que esta proteína podría contribuir a la virulencia de *Salmonella* y por lo tanto consideramos que es de interés estudiarla.

En este trabajo determinamos la localización subcelular de YgaU en *Salmonella enterica* para lo cual etiquetamos YgaU mediante fusión de su secuencia codificadora a la secuencia codificadora de 3 copias en tándem del epítipo FLAG (3xFLAG), lo que nos permitió detectarla por métodos inmunológicos. Esto es importante dado que no existen anticuerpos

disponibles para esta proteína. Determinar la localización subcelular puede contribuir a comprender qué función cumple YgaU en *Salmonella* y como contribuye a la virulencia. Además, el etiquetado de esta proteína permitirá en un futuro identificar posibles proteínas que interactúen con YgaU, mediante la técnica de inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas.

## 2. Objetivos

**2.1 Objetivo general:** Determinar la localización subcelular de la proteína YgaU en *Salmonella enterica*.

**2.2 Objetivos específicos:**

1. Etiquetar la proteína YgaU con el epítipo 3xFLAG.
2. Verificar el correcto etiquetado de YgaU.
3. Determinar la localización subcelular por fraccionamiento subcelular y Western Blot.
4. Visualizar la localización subcelular por inmunofluorescencia y microscopía confocal.

## 3. Materiales y métodos

**3.1 Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento:**

En condiciones normales las cepas se crecieron en medio rico 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 o ampicilina 100µg/ml). Las cepas se almacenaron a largo plazo en caldo LB conteniendo 16,6% de glicerol, a -80°C.

En las tablas 1 y 2 se enlistan las cepas utilizadas en este trabajo. A excepción de la cepa de referencia, los aislamientos fueron obtenidos en Uruguay gentilmente cedidos por el Centro Nacional de *Salmonella*.

**Tabla 1.** Aislamientos de *S. Dublin* y *S. Enteritidis* empleados en este trabajo.

Cepa bacteriana	Año de Aislamiento	Origen	Serotipo
SDU5	2000	Heces humanas	<i>S. Dublin</i>
8/02	2002	Heces humanas	<i>S. Enteritidis</i>
83/10	2010	Heces humanas	
PT4 (P125109)	Cepa de referencia de <i>S. Enteritidis</i>	Brote en humanos [12]	

Se dispone de las secuencias genómicas completas de los cuatro aislamientos. La cepa 8/02 porta una mutación en el gen *rpoS* que introduce un codón stop prematuro.

**Tabla 2.** Construcciones bacterianas (cepas etiquetadas) realizadas en este trabajo.

Cepa bacteriana	Características
SDu5 <i>ygaU::FLAG</i>	Cepa SDU5 con el gen <i>ygaU</i> etiquetado en fase de lectura con el epítipo 3xFLAG, Kan <sup>R</sup>
SEn 8/02 <i>ygaU::FLAG</i>	Cepa 8/02 con el gen <i>ygaU</i> etiquetado en fase de lectura con epítipo 3xFLAG Kan <sup>R</sup>
SEn 83/10 <i>ygaU::FLAG</i>	Cepa 83/10 con el gen <i>ygaU</i> etiquetado en fase de lectura con epítipo 3xFLAG Kan <sup>R</sup>

Para lograr las condiciones que imitan el ambiente intestinal se utilizó un medio denominado GMC que consiste en caldo LB suplementado con 25mM de acetato de sodio, 3μM de deoxicolato de sodio, 0,37M NaCl, pH 7 [30][31]. Además, los tubos se incubaron sin agitación, para lograr condiciones de baja aerobiosis. Primero los cultivos fueron crecidos toda la noche en medio LB sin agitación a 37 °C y al día siguiente se diluyeron 1/50 en medio GMC y se incubaron a 37°C sin agitación hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub> de 0,5 aproximadamente.

### 3.2 Plásmidos

**Tabla 3.** Lista de plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características
pSUB11	Vector que contiene el cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT y 3 copias en tándem del epítipo FLAG (3xFLAG), Kan <sup>R</sup> [32].
pKD46	Vector de bajo número de copias, que transporta los genes del sistema Red de la recombinasa del fago λ (γ, β & exo) bajo el control del promotor inducible por arabinosa P <sub>araBAD</sub> . Replicación termosensible, Amp <sup>R</sup> [33].

### 3.3 Cebadores

Para diseñar los cebadores analizamos el gen *ygaU* y su entorno a partir del genoma anotado en NCBI (SEN\_RS13740) de la cepa de referencia *Salmonella* Enteritidis P125109.

También nos valimos de la secuencia del plásmido pSUB11 de la página addgene (<https://www.addgene.org/169699/>) para diseñar la región del cebador que hibridaría con el plásmido.

Tuvimos en cuenta el marco de lectura y eliminar el codon stop para que la proteína se pudiera sintetizar correctamente y fusionada en su extremo Ct al epítipo 3xFLAG. El codón stop se encontraba luego del epítipo 3xFLAG en el pSUB11.

También utilizamos los cebadores k1, k2, *ygaE\_R* y SEN2639P\_R, los cuales se encontraban disponibles en el laboratorio, para verificar el etiquetado mediante PCR.

**Tabla 4.** Lista de cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Aplicación
pSUB11-F pSUB11-R	GACTACAAAGACCATGACGG CATATGAATATCCTCCTAG	Amplificación de la región de interés del plásmido pSUB11 (3xFLAG y gen de resistencia a kanamicina).
ygaU_FLAG_F ygaU_FLAG_R	<u>CCGGAAAAAATATATCCGGGACAAGTGTGCGTATTCCTG</u> <u>AAGAAGACTACAAAGACCATGACGG</u> <u>CAGGCGATGGCAGGGAAAAATGTAGCCTGGCGCGACCTGA</u> <u>TAGCCACATATGAATATCCTCCTTAGTTC</u>	Amplificación del cassette de resistencia a kanamicina y el epítipo 3xFLAG con regiones de homología al genoma de <i>Salmonella</i> . Se subraya la región homóloga al cromosoma.
ygaE_R	ACCAAATAAAGCGGTAGCGG	Cebador que hibrida con gen corriente abajo a <i>ygaU</i> . Utilizado para la verificación de la construcción.
K1 K2	CAGTCATAGCCGAATAGCCT CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Cebadores que hibridan dentro del cassette de resistencia a kanamicina. Utilizados para la verificación de la construcción.
SEN2639P_R	AGCAGCGTTGACGATCAGG	Cebador que hibrida dentro del gen <i>ygaU</i> Utilizado para la verificación de la construcción.

### 3.4 Construcción de las cepas etiquetadas *ygaU:FLAG*

Para la construcción se aplicó el protocolo basado en PCR de Uzzau, et al., 2001 [32] (variación del método de Datsenko, et al., 2000 [33]) en las cepas SDu5 y PT4.

#### 3.4.1 Obtención del fragmento de ADN a insertar en el genoma

Primero se realizó la amplificación por PCR de la región que contenía el cassette de resistencia a kanamicina y el epítipo 3xFLAG en el vector pSUB11 utilizando los cebadores pSUB11-F y pSUB11-R. Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 98°C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos de tres pasos; desnaturalización a 98°C por 10 segundos, hibridación a 52°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos. Se realizó un último ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos. El resultado de la PCR es un fragmento de ADN de un tamaño de 1547 pb. Se purificó de un gel preparativo mediante el kit QIAEX II (Qiagen). Este fragmento se utilizó como molde en una nueva PCR, utilizando ahora los cebadores con extensiones ygaU\_FLAG\_F e ygaU\_FLAG\_R de 65 y 68 nucleótidos respectivamente. El cebador forward contiene 45 nucleótidos que corresponden con la secuencia idéntica de la región C-terminal de la proteína YgaU sin el codón stop y los restantes 20 nucleótidos hibridan con el molde del vector pSUB11. El cebador reverse contiene 23 nucleótidos que hibridan con el molde del vector pSUB11 y 45 nucleótidos que corresponden con la secuencia idéntica la región corriente abajo inmediatamente después del gen *ygaU*, de los cuales 21 nucleótidos corresponden a una región intergénica y 24 nucleótidos a una porción de un gen denominado *ygaE*. Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 98°C durante 30 segundos, seguido de 5 ciclos de tres pasos; desnaturalización a 98°C por 10 segundos, hibridación a 53°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos. Luego se realizaron 2 ciclos donde se cambió la temperatura de hibridación a 58°C manteniendo las mismas temperaturas de desnaturalización y extensión. Por último se realizaron 28 ciclos con una temperatura de hibridación de 63°C. Se realizó un último ciclo de extensión final a 72°C por

5 minutos. De esta PCR se obtuvo un fragmento de 1637 pb que se utilizó para electroporar las cepas SDu5 y PT4 portadoras del pKD46. Se purificó por electroforesis preparativa mediante el kit QIAEX II.

Para todas las amplificaciones se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de alto rendimiento y actividad *proofreading* (Thermo Scientific).

### 3.4.2 Preparación de células competentes y transformación

Las cepas SDu5 y PT4 que contenían el vector pKD46 fueron crecidas toda la noche a 30 °C con agitación en caldo LB con el agregado de ampicilina. Luego se diluyó 1/100 y se incubó en las mismas condiciones por 2 hs y se agregó 10 mM de arabinosa para inducir la síntesis de la recombinasa del fago  $\lambda$  hasta alcanzar una  $D.O_{600} \sim 0,5$ . Las células se dejaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 4°C a 5000 rpm por 10 minutos. Se resuspendieron en agua miliQ (ice cold) y se centrifugaron 10 minutos más a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 4 mL de glicerol 10%. Se volvió a centrifugar en frío y se resuspendieron en 160  $\mu$ L de glicerol 10% y se separó en alícuotas de 60  $\mu$ L. Luego se colocaron en cubetas de electroporación junto con el fragmento de ADN a insertar y dentro de la cámara de electroporación se aplicó un voltaje de 1750 V (50 mA). Inmediatamente después se transfirieron a un caldo SOC precalentado a 37 °C y se incubó en agitación y a 37°C durante 2 horas, permitiendo que se dé la recombinación y que se exprese la resistencia a kanamicina. Posteriormente se plaquearon en LBA conteniendo kanamicina y se incubaron a 37°C. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina las cuales se re-estriaron en LBA con kanamicina y en paralelo con ampicilina. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina (indicativo de que incorporaron en el cromosoma el producto de PCR con el cassette de kanamicina y que perdieron el plásmido pKD46). A las cepas resultantes se les denominó SDu5 *ygaU:FLAG* y SE en PT4 *ygaU:FLAG*

### 3.4.3 Verificación del etiquetado mediante PCR

Se extrajo el ADN de las cepas transformantes mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) y se realizaron tres PCRs combinando los cebadores según tabla 5. Para estas PCRs se utilizó la Taq DNA polymerase. Luego se analizaron los productos de PCR en gel de agarosa 0.8%.

**Tabla 5.** Combinación de cebadores utilizados en la PCR de verificación del etiquetado.

	Cebador Forward	Cebador Reverse	Tamaño esperado para cepa salvaje	Tamaño esperado para cepa etiquetada
PCR A	SEN2639P_R	K1 (R)	No amplifica	777 bp
PCR B	K2 (F)	ygaE_R	No amplifica	1206 pb
PCR C	SEN2639P_R	ygaE_R	529 pb	2072 pb



### 3.4.4 Transducción a nuevos fondos genéticos

Siguiendo la recomendación de Uzzau et al 2001, transferimos mediante transducción con el fago P22 que infecta a *Salmonella* el gen etiquetado a nuevos fondos genéticos que nunca hubieran portado la recombinasa del fago  $\lambda$ , evitando así mutaciones no deseadas. Seleccionamos las cepas SDu5, SEn 83/10 y SEn 8/02 como cepas receptoras.

#### 3.4.4.1 Preparación de los lisados sobre las cepas etiquetadas SDu5 *ygaU:FLAG* y SEn *ygaU:FLAG*

Se hicieron diluciones seriadas de un stock de fagos P22 en buffer SM y se mezclaron 100  $\mu$ L de cada dilución con 200  $\mu$ L de cultivo ON de la cepa donadora (SDu5 *ygaU:FLAG* ó SEn *ygaU:FLAG*). Se dejó adsorber a 37°C durante 45 min. La mezcla se agregó a 3 mL de top agar (LBA conteniendo 0,6% de agar) precalentado a 42°C y se volcó sobre placas de LBA, las cuales se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente el top agar se levantó 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 2700g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se guardó a 4°C con 50  $\mu$ L de cloroformo.

#### 3.4.4.2 Transducción del etiquetado a cepas SDu5, SEn 83/10 y SEn 8/02

Se mezclaron 200 $\mu$ L de cultivo ON de las cepas receptoras (SDu5, SEn 83/10 y SEn 8/02) con 0 $\mu$ L, 1 $\mu$ L, 10 $\mu$ L y 50 $\mu$ L de lisados de P22 hechos sobre cepas receptoras. Se incubaron a 37°C por 45 minutos. Luego se le agregó 800 $\mu$ L de LB + 5mM de EGTA y se incubó por 1 hora a 37°C. Se centrifugó por 5 minutos a 6500 rpm y el pellet se resuspendió en 100 $\mu$ L de LB, el cual se sembró en placas de LBA + EGTA 5mM + kanamicina. Las colonias aisladas que se obtuvieron se re-sembraron en medio de cultivo EBU agar y nuevamente en LBA + EGTA 5mM + kanamicina 50. El medio EBU agar nos permitió discriminar colonias que estuvieran contaminadas con el fago P22 luego de realizada la transducción ya que las colonias contaminadas crecen en este medio de color azul oscuro y las no contaminadas se observan de color celeste claro. El medio EBU agar se prepara agregando a 100 ml de LBA 0,25g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25g de D-glucosa, 0,125 ml de una solución 1% de Evans Blue, 0,25 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 + kanamicina se seleccionaron como posibles cepas etiquetadas. También se realizó una prueba de lisogenia sobre las colonias seleccionadas. Para ello se realizó una estría de lisado de fagos P22 en una placa de LB y de forma perpendicular a ésta se estriaron las colonias seleccionadas. Las colonias lisogénicas no pueden ser infectadas por fagos (adquieren resistencia) y por lo tanto atraviesan la estría del lisado de fagos. Seleccionamos las colonias que no crecieron del otro lado de la estría de lisado de fagos.

### **3.5 Verificación del etiquetado de YgaU mediante Western Blot de los extractos proteicos totales**

#### **3.5.1 Preparación de extractos proteicos para western blotting**

Las bacterias se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en caldo LB y al día siguiente los cultivos se diluyeron 1/100 en el mismo medio. Se dejaron crecer hasta fase exponencial ( $DO_{600} \sim 0,5$ ) y se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm a 4°C. Se resuspendieron en PBS frío y se sonicaron mediante 6 pulsos de 5" cada uno (en hielo). Los extractos sonicados se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C para remover células no rotas y los sobrenadantes se cuantificaron por Bradford para analizar por western blotting. El mismo protocolo se aplicó a cultivos crecidos en GMC (como se detalla en la sección 3.1).

#### **3.5.2 Western Blot de los extractos proteicos totales**

Para todos los Western Blot las muestras se mezclaron con Loading Buffer (1X final), se hirvieron durante 5 minutos. Se cuantificó la cantidad de proteína en cada extracto por el método de Bradford y se cargaron 30µg de proteína por pocillo en geles de SDS-PAGE al 12%. Como marcador de peso molecular se utilizó en todos los casos PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Se corrieron en cubas de electroforesis con buffer Tris-Gly-SDS 1X y se aplicó un campo eléctrico mediante una fuente eléctrica con un amperaje constante de 35mA. Posteriormente se realizó la transferencia en condiciones semi-húmedas a membranas de Inmobilon P (PVDF) (Millipore) activada en metanol y buffer de transferencia. Para ello se armó un "sándwich" entre dos láminas de papel Whatman, el gel, la membrana PVDF y 3 láminas de papel Whatman, todo remojado en buffer de transferencia. Se colocó en una cubeta de transferencia con hielo y, según el caso, se aplicó un amperaje constante de 80mA durante toda la noche o 400mA por 2:30 hs. La membrana se incubó en solución de bloqueo por 1h a 4°C. La solución de bloqueo consiste en TBST (para 1 L: 100 mL de TBS 10x + 900 mL agua destilada + 1mL de Tween20) y leche en polvo 5%.

Luego se incubó con el anticuerpo primario por 1 h a 37°C en agitación. Se realizaron varios lavados en TBST y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa (HRP) por 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente varias veces en TBST y se incubó por 5 minutos con los sustratos de la HRP provistos en el kit GE Healthcare Amersham ECL Select que funciona para la detección de Western blotting quimioluminiscentes. Se capturaron imágenes en ausencia de luz mediante el equipo GBox de Syngene.

Para el Western Blot de los extractos proteicos totales de las cepas crecidas en GMC o LB se cargaron 30µg de proteína por pocillo y posteriormente a la transferencia la membrana se incubó con el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG (Sigma-Aldrich, hecho en rata) diluido 1/5000 en solución de bloqueo y luego con el anticuerpo  $\alpha$ -IgG RAT-HRP (Sigma-Aldrich) diluido 1/4000.

### **3.6 Fraccionamiento subcelular**

La separación de las fracciones subcelulares se realizó partiendo de cepas crecidas en condiciones GMC y LB, aplicando el protocolo 4 y 5 de Thein, et al., 2010 [34], con modificaciones. Brevemente, se realizó un cultivo OD en 50 mL de GMC a partir de 1 mL de cultivo bacteriano ON (LB sin agitación y con poca aeración a 37°C). Se centrifugaron 50 mL de células bacterianas por 10 minutos a 7.649g a 4°C y se resuspendieron en 1 mL de Tris-Sacarosa (T-S, Tris-HCl 30mM, pH 8, sacarosa 20%). Se añadió EDTA a 5mM y lisozima a 250µg/ml. Se incubó en hielo 10-20 minutos y posteriormente se añadió CaCl<sub>2</sub> a 20mM y NaCl 100mM. Se centrifugó a 38724g y se recuperó el sobrenadante como fracción periplásmica (FP). El pellet se resuspendió en 0,5mL de Tris-HCl 30mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5mM y DNAsa 1µg/ml. En el caso de las bacterias crecidas en GMC se aplicó una leve sonicación y shock térmico mediante congelado y descongelado en este paso. Posteriormente se centrifugó a 38724g y el sobrenadante se recuperó como fracción citosólica (FC). El pellet se resuspendió en 100 µL de tampón Tris-HCl 30 mM, pH8 y EDTA 1 mM y corresponde a la fracción de membrana (FM). Se cuantificó por Bradford la concentración proteica en cada fracción para analizar por western blotting.

#### **3.6.1 Western Blot de las fracciones subcelulares crecidas en condiciones óptimas**

Se cargaron los volúmenes recomendados en el protocolo de fraccionamiento subcelular para el análisis por Western Blot: 22,5 µL de FP; 7,5 µL de FC; 3 µL de FM. En este caso la membrana se incubó con α-DnaK diluido 1/5000 y α-FliC (Pro Lab) diluido 1/1000 como anticuerpos primarios. Luego se revelaron con α-IgG MOUSE-HRP (GE Healthcare) y α-IgG RABBIT-HRP (Sigma-Aldrich) respectivamente, ambos diluidos 1/5000 en solución de bloqueo.

#### **3.6.2 Western Blot de las fracciones subcelulares crecidas en condiciones GMC**

Para este western blot no se cargaron las mismas cantidades de proteína por pocillo como en los casos anteriores sino que se realizó un cálculo para cargar cantidades de proteína equivalentes al número de células de partida, lo que resultó en 8 µg de proteína de la FP, 24,9 µg de proteína de la FC y 30,16 µg de proteína de la FM, para la cepa 83/10. En el caso de la cepa S Du5 se cargaron 9,95 µg de proteína de la FP, 36,64 µg de proteína de la FC y 44,6 µg de proteína de la FM. Se revelaron con los anticuerpos α-FLAG, α-DnaK y α-FliC en las diluciones mencionadas anteriormente.

### **3.7 Visualización de la localización subcelular de YgaU mediante microscopía confocal de Fluorescencia.**

Para visualizar las bacterias al microscopio se aplicó el protocolo de Addinall, et al., 1996 [35] con modificaciones. Las bacterias crecidas en GMC se fijaron directamente en el medio de cultivo mediante la adición de paraformaldehído 2,6 % (vol/vol) y glutaraldehído 0,04 %

(vol/vol) durante 10 minutos a TA y 50 minutos más en hielo. Se lavó 3 veces con PBS mediante centrifugación a 6500 rpm por 5 minutos y se resuspendió en 100  $\mu$ L de GTE (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 20 mM Tris [pH7.5]). Para la permeabilización se añadió lisozima recién preparada en GTE. Se probaron 3 concentraciones diferentes de lisozima (8  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL y 50  $\mu$ g/mL ) para evaluar en que concentración se obtenían mejores resultados. Las células se transfirieron inmediatamente a cubreobjetos de microscopio pretratados con poli-L-lisina (0,1 % [p/vol]) y se dejó actuar durante 1 minuto. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se dejó secar al aire. Luego se rehidrataron durante 4 minutos con 10  $\mu$ L de PBS. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos se realizó un bloqueo con 100  $\mu$ L de BSA 2% en PBS por 15 minutos a TA.

Como anticuerpo primario se utilizó según sea el caso  $\alpha$ -DnaK (100  $\mu$ L, 1:500) y  $\alpha$ -FLAG (100  $\mu$ L, 1:250) en BSA-PBS. Se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se lavó diez veces con PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario (10 $\mu$ L, 1:100). Según sea el caso se utilizó  $\alpha$ -RAT conjugado a Alexa fluor 555 (invitrogen) y  $\alpha$ -MOUSE conjugado a FITC (BD Biosciences) en BSA-PBS durante 1:30 h en la oscuridad a TA, se lavó diez veces con PBS y se hizo un último lavado en H<sub>2</sub>O. Los cubreobjetos se colocan con la cara que contiene las célula fijadas en 2  $\mu$ L de SlowFade con DAPI 10  $\mu$ g/mL sobre los portaobjetos.

### 3.8 Predicción de la estructura tridimensional de YgaU fusionada al epítipo 3xFLAG

Para predecir la estructura tridimensional de YgaU fusionada al epítipo 3xFLAG se utilizó como predictor el programa AlphaFold2 [36] (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=mbalO9pWjaN0>) y como molde la predicción de la estructura tridimensional de YgaU sin la fusión con el número de acceso de la entrada de UniProt Q8ZML9.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Construcción de las cepas etiquetadas *ygaU::FLAG*

Se construyeron 2 cepas con el gen *ygaU* etiquetado en fase de lectura con tres copias en tándem del epítipo FLAG (3xFLAG), una en *S. Enteritidis* cepa P125109 y otra en *S. Dublin* cepa SDu5. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina en medio LBA con el antibiótico correspondiente. La resistencia a kanamicina la proporciona el cassette de resistencia insertado en el genoma mientras que la sensibilidad a ampicilina nos indica que la cepa resultante ha perdido el plásmido pKD46 necesario para la recombinación homóloga pero prescindible para los pasos posteriores. Como controles se plaquearon en LBA con kanamicina o ampicilina las cepas que no fueron electroporadas sin obtener colonias resistentes.

En la **figura 2** se esquematizan los pasos para obtener la construcción *ygaU::FLAG* y su inserción a nivel del genoma.

Para la síntesis del módulo de DNA a insertar en el genoma realizamos una PCR utilizando cebadores con extensiones (**figura 2 a y b**). Éstos podían provocar amplificaciones inespecíficas en la PCR debido a su largo y a sus extremos desapareados. Por ello realizamos pruebas variando algunos parámetros de la PCR como la concentración de los cebadores y del molde de DNA, y de la temperatura de hibridación, y evaluamos su rendimiento mediante electroforesis en gel de agarosa (**figura 2 g**). Obtuvimos entonces un amplicón de un largo de 1637 pb que contiene en uno de sus extremos la secuencia de la región 3' del gen *ygaU* y en el otro la secuencia de la región corriente abajo a *ygaU* (**figura 2 c**). Luego de la electroporación las células se incubaron durante 1 hora a 37°C sin antibiótico para que se realice la recombinación entre el fragmento y el cromosoma, y se exprese la resistencia al antibiótico (**figura 2 d, e y f**).

#### 4.2 Verificación del etiquetado molecular de *ygaU* mediante PCR

Para verificar si el módulo de ADN se insertó exitosamente en el genoma diseñamos tres PCRs que, mediante el análisis de los tamaños de sus productos por electroforesis en gel de agarosa, nos indicarían la presencia o ausencia del módulo en la localización esperada en el genoma (**figura 3**). En la tabla 5 se proporcionan los cebadores utilizados para las tres PCRs y en la **figura 4** se esquematizan los amplicones obtenidos. Los tamaños esperados se calcularon a partir de la secuencia del genoma de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis cepa P125109 anotada en la base de datos del NCBI y la secuencia del módulo de ADN.

La PCR A utiliza como cebador forward a SEN2639P\_R que hibrida dentro del gen *ygaU* y como cebador reverse a K1 (R) que hibrida dentro del cassette de resistencia a kanamicina (**figura 4**), por lo que esperamos observar un producto de PCR de 777 pb en las cepas etiquetadas y no esperamos amplificación en la cepa salvaje, lo que se condice con el resultado observado en la electroforesis en gel de agarosa (**figura 3**, PCR A).

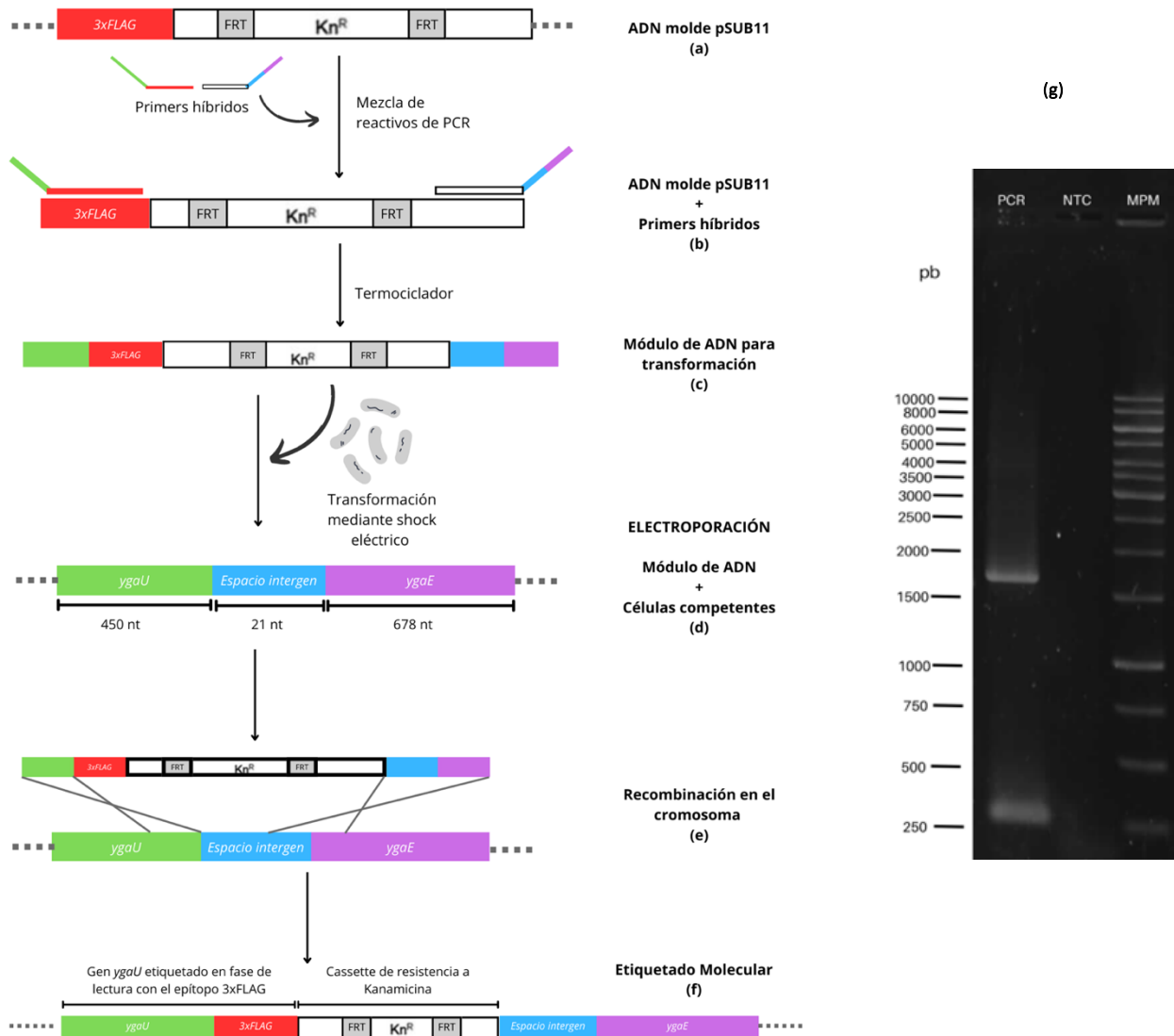
La PCR B utiliza como cebador forward a K2 (F) que hibrida dentro del cassette de resistencia a kanamicina y como cebador reverse a *ygaE\_R* que hibrida con el gen *ygaE* ubicado corriente abajo al gen *ygaU*. De esta PCR esperamos un producto de amplificación de 1206 pb en las cepas etiquetadas y no esperamos amplificación en la cepa salvaje (**figura 3**, PCR B).

Para la PCR C se utilizaron los cebadores SEN2639P\_R como cebador forward e *ygaE\_R* como cebador reverse. Estos cebadores hibridan dentro del gen *ygaU* o dentro del gen *ygaE*, respectivamente. Entonces, luego de la PCR tanto la cepa salvaje como en las cepas etiquetadas darían un producto de amplificación y la diferencia radicaría en los tamaños, ya que la cepa etiquetada tiene un módulo de ADN de 1547 pb insertado entre ambos genes, mientras que la cepa salvaje contiene un espacio intergen de 21 pb (**figura 3**, PCR C).

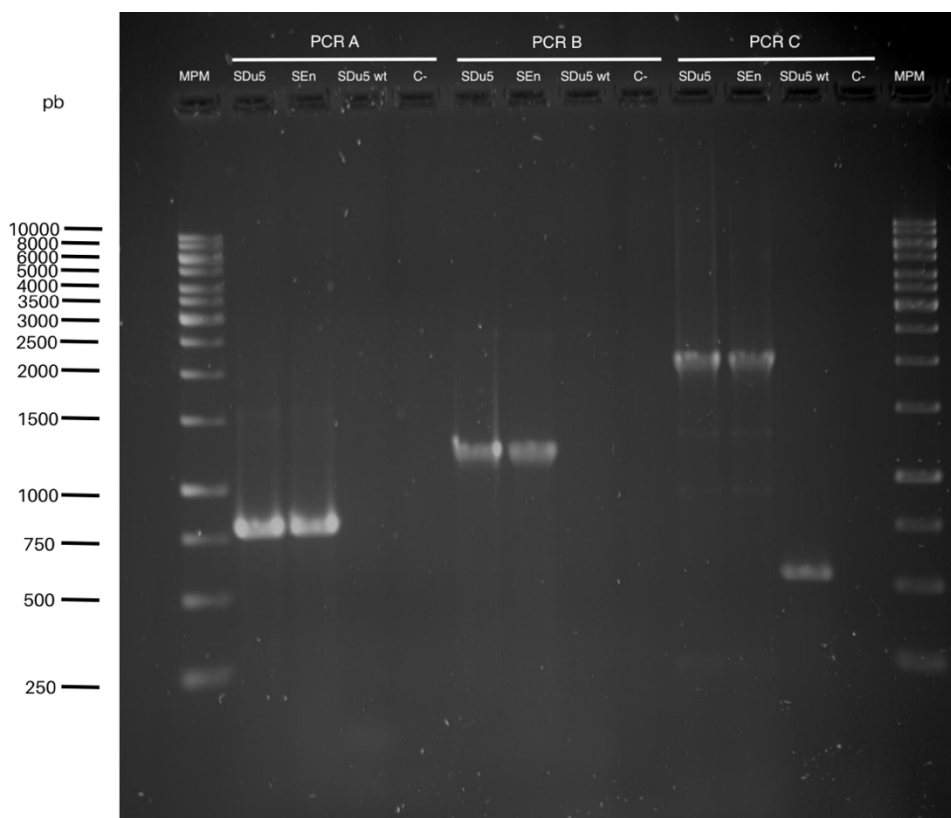
Con estos resultados pudimos verificar que las construcciones fueron exitosas.

Para continuar con el trabajo se realizó la transducción de las construcciones mediante el fago p22 a nuevos fondos genéticos que no hayan portado la recombinasa del fago  $\lambda$  y evitar así recombinaciones indeseadas que puedan haber ocurrido. Las cepas receptoras seleccionadas fueron *S. Dublin* 5, *S. Enteritidis* 83/10 y *S. Enteritidis* 8/02. Se realizó un ensayo

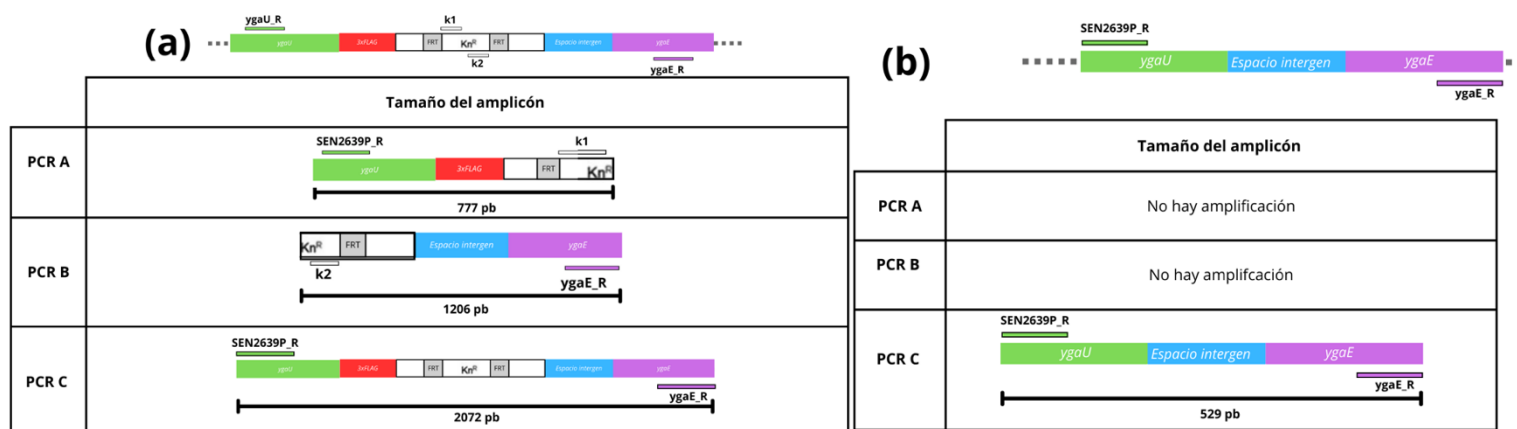
para evaluar la pseudolisogenia de las colonias transductantes en placas de EBU (Evans Blue). Se seleccionaron 2 colonias claras de cada cepa y se realizó un ensayo de lisogénia. Se seleccionó un transductante libre de fago de cada cepa para continuar con el trabajo.



**Figura 2. Esquema del proceso realizado para el etiquetado molecular de *ygaU*.** (a) Molde de ADN que contenía 3 copias en tándem del epítipo FLAG y el cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT. (b) Los cebadores híbridos hibridan con el molde. (c) Luego de la PCR se obtiene un módulo de ADN con extremos homólogos al genoma bacteriano que será utilizado para la transformación. (d) El módulo de ADN se introduce en las células competentes de SEn P125109 y SDu 5 (portadoras del pKD46) mediante electroporación. (e) El módulo de ADN es insertado en el genoma mediante recombinação por la recombinasa del fago  $\lambda$  (f) Obtenemos cepas que contienen el gen *ygaU* etiquetado en fase de lectura con el epítipo 3xFLAG y que son resistentes a kanamicina. (g) Electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de PCR de la reacción con cebadores extendidos para obtener el producto para la electroporación. Carril 1: Producto de PCR, Carril 2: Control negativo sin template de DNA, Carril 3: Marcador de peso molecular (MPM).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de los productos de PCR de SDu5 transformante 1, SEn transformante 1 y SDu5 salvaje para la verificación de la construcción. PCR A: Productos de PCR utilizando como cebadores a k1 (R) y SEN2639P\_R F; PCR B: Productos de PCR utilizando como cebadores k2 (F) y ygaE\_R; PCR C: Productos de PCR utilizando como cebadores SEN2639P\_R y ygaE\_R. En todos los casos el control negativo (C-) consistió en todos los reactivos a excepción del molde de DNA.

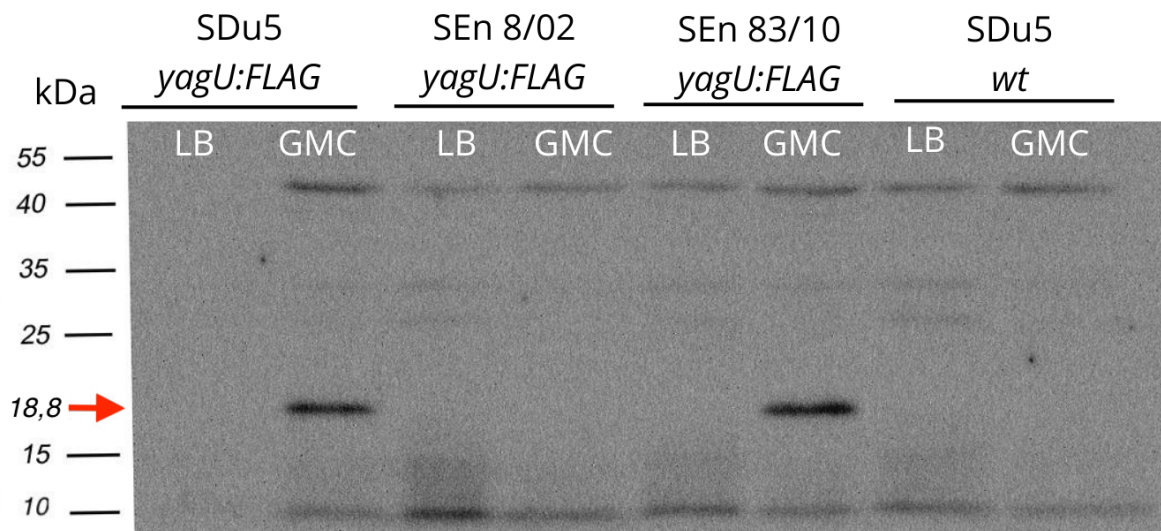


**Figura 4.** Esquema de los productos de PCR obtenidos en función de los juegos de cebadores utilizados. (a) Amplicones obtenidos a partir de las cepas etiquetadas. (b) Amplicones obtenidos a partir de las cepas salvajes.

### 4.3 Puesta a punto para la detección de la proteína YgaU por Western Blot

Verificamos que el etiquetado de YgaU fue exitoso mediante el análisis de los extractos proteicos totales de bacterias crecidas en condiciones óptimas de crecimiento (LB con agitación a 37°C) o en condiciones de estrés (GMC) mediante Western Blot, usando anticuerpos específicos para el epítipo FLAG (*figura 5*).

En las cepas etiquetadas SDu5 *ygaU:FLAG* y SEn 83/10 *ygaU:FLAG* que fueron crecidas en medio GMC se puede observar una banda a la altura de los 18,8 kDa que se corresponde con el peso molecular teórico de la proteína YgaU al estar fusionada al epítipo 3xFLAG, indicando nuevamente que el etiquetado fue exitoso y que la proteína etiquetada efectivamente puede ser detectada mediante western blot usando anti-FLAG. Como era de esperarse no es detectable en la cepa salvaje debido a que no está etiquetada con el epítipo 3xFLAG, ni tampoco en las cepas SDu5 *ygaU:FLAG*, SEn 8/02 *ygaU:FLAG* y SEn 83/10 *ygaU:FLAG* crecidas en condiciones óptimas, debido a que YgaU está regulada por el factor sigma alternativo RpoS responsable de la respuesta general al estrés. Lo que resulta llamativo es que en el extracto proteico de la cepa etiquetada SEn 8/02 *ygaU:FLAG* crecida en condiciones GMC no se observa expresión de la proteína YgaU. Esto se debe a que la cepa SEn 8/02 tiene una mutación en el gen *rpoS* que genera un codón stop prematuro y por lo tanto una proteína disfuncional, por lo que la expresión de *ygaU* se ve afectada (Tesis de Maestría de Julieta Bisio, en proceso de escritura).

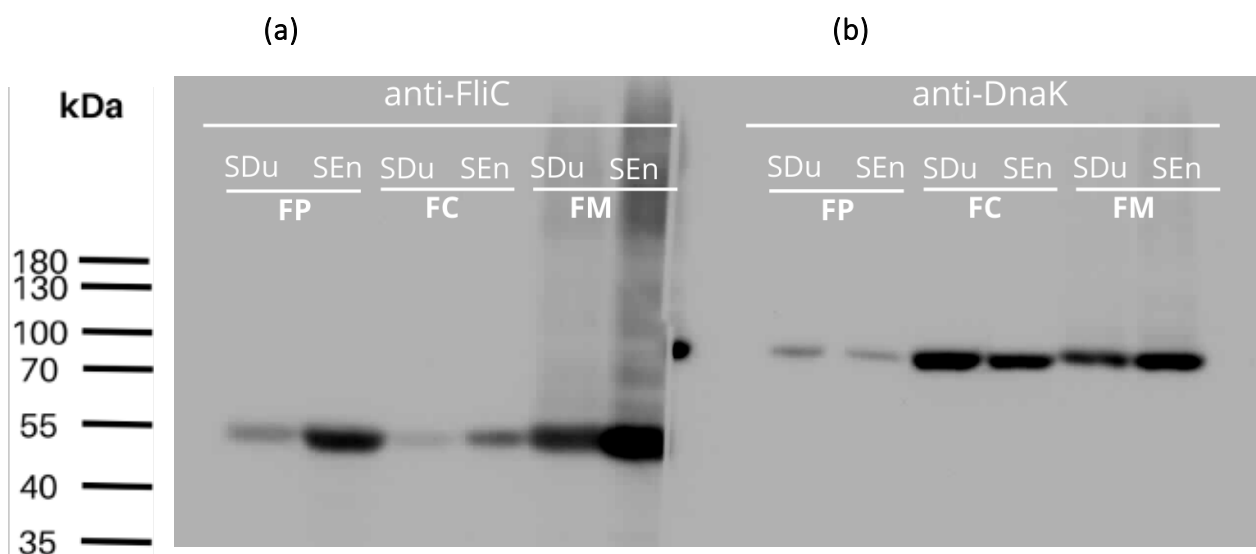


**Figura 5.** Western Blot de los extractos proteicos totales obtenidos de cepas crecidas en diferentes condiciones de crecimiento (LB o GMC) para la detección de la proteína YgaU mediante el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG. A la izquierda se marcan los pesos moleculares y con una flecha se resaltan los 18,8 kDa, tamaño correspondiente a la proteína YgaU fusionada con el epítipo 3xFLAG. Encima de cada carril se especifican las cepas y la condición de crecimiento de las bacterias a partir de las cuales se obtuvieron los extractos.



#### 4.4 Puesta a punto del fraccionamiento subcelular

Realizamos el fraccionamiento subcelular partiendo de bacterias crecidas en condiciones óptimas (LB, agitación a 37°C) o en GMC, obteniendo las fracciones periplásmica (FP), citoplásmica (FC) y de membrana (FM). Esta última fracción contiene tanto la membrana interna como la membrana externa. Visualizamos la localización subcelular de dos proteínas de localización conocida mediante Western Blot para validar el fraccionamiento subcelular (*figura 6*) partiendo de las fracciones obtenidas de bacterias crecidas en condiciones óptimas. Se cargaron 22,5µL de FP, 7,5µL de FC y 3µL de FM según se indica en el protocolo. DnaK es una chaperona de 70 kDa que se localiza en el citoplasma y en la membrana [37], mientras que FliC es una subunidad proteica de 52 kDa que se polimeriza para formar los filamentos de los flagelos, localizada en membrana y periplasma [38]. Conociendo sus localizaciones subcelulares pudimos verificar entonces que el fraccionamiento subcelular mediante el protocolo elegido fue exitoso.

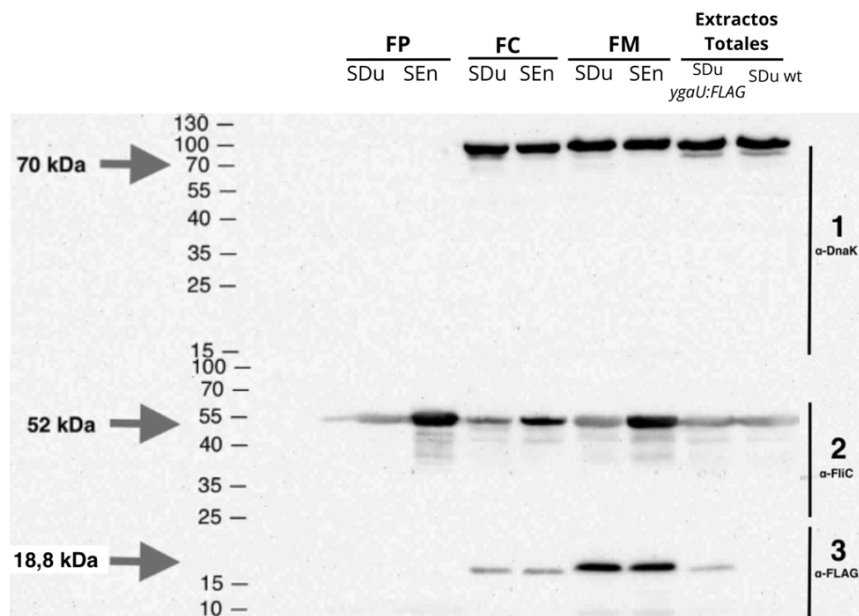


**Figura 6.** Western Blot de las fracciones subcelulares de las cepas SDu5 *ygaU:FLAG* y SEn 83/10 *ygaU:FLAG* crecidas en condiciones óptimas. (a) Membrana revelada con anticuerpo  $\alpha$ -FliC. (b) Membrana revelada con anticuerpo  $\alpha$ -DnaK. A la izquierda se marcan los pesos moleculares. Encima de cada carril se especifica a que fracción y a que cepa corresponde. FP: Fracción periplásmica; FC: Fracción citosólica; FM: Fracción de membrana.

#### 4.5 Determinación de la localización subcelular de YgaU mediante Western Blot

Para determinar la localización subcelular de YgaU por Western Blot utilizamos las fracciones obtenidas de bacterias crecidas en medio GMC (*figura 7*). Se realizaron controles del fraccionamiento subcelular al incubar las membranas con los anticuerpos  $\alpha$ -DnaK y  $\alpha$ -FliC. También se sembraron los extractos proteicos totales de la cepa etiquetada SDu5 *ygaU:FLAG* y la cepa SDu5 salvaje, de manera de tener un control positivo y negativo respectivamente del etiquetado. Como se puede observar en la figura 7, YgaU se localizó en la fracción de membrana mayoritariamente tanto en SDu5 como en SEn 83/10. También se detectó una

pequeña cantidad en la fracción citosólica probablemente debido a que YgaU se sintetiza en este compartimento y el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG lo puede estar detectando. Las proteínas DnaK y FliC se localizaron en las fracciones subcelulares esperadas, validando el fraccionamiento subcelular. Resulta interesante destacar como se observan niveles de expresión más bajos de FliC en SDu5 en comparación con la cepa SEn 83/10, aunque se hayan sembrado las mismas cantidades de proteína. Además esta diferencia no se observa en la proteína DnaK. Una respuesta inflamatoria intestinal aguda inducida por *Salmonella* se postula como un mecanismo para prevenir la diseminación bacteriana a los sitios sistémicos [20]. Los flagelos proporcionan motilidad a *Salmonella* y contribuyen directamente a una respuesta inflamatoria intestinal aguda ya que FliC es reconocido por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares de tipo Toll-like receptor 5 (TLR5) y Naip5/NLRC4 [39][40]. Éstos desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por la expresión de la interleucina 8, CCL20 (del inglés Chemokine C-C motif ligand 20), y varias otras quimioquinas proinflamatorias [41] que reclutan neutrófilos y células dendríticas en el compartimento subepitelial. Las diferencias observadas en este ensayo en los niveles de expresión de FliC podrían explicar porqué *S. Dublin* causa con mayor frecuencia infecciones invasivas y menos gastroenteritis que *S. Enteritidis*, dado que generaría una respuesta inflamatoria menor a nivel intestinal [42].

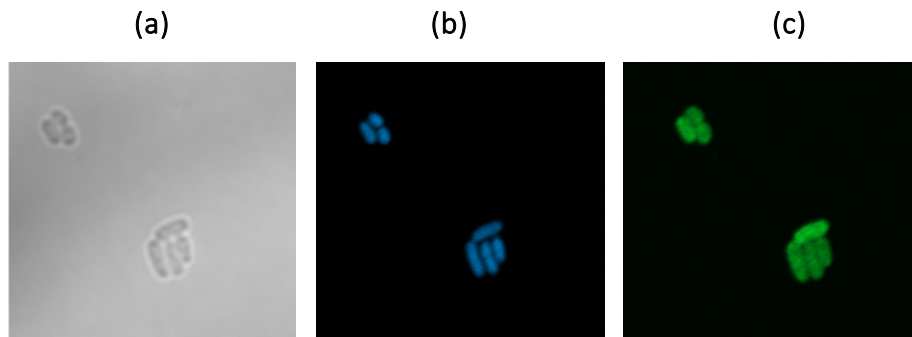


**Figura 7.** Western Blot de las fracciones subcelulares de las cepas SDu5 ygaU:FLAG y SEn 83/10 ygaU:FLAG crecidas en condiciones que imitan el ambiente intestinal (GMC). A la izquierda se observan los marcadores de peso molecular y se señalan con flechas los tamaños de DnaK, FliC y YgaU (70 kDa, 52 kDa y 18,8 kDa respectivamente). **1)** Membrana revelada para detectar DnaK. **2)** Membrana revelada para detectar FliC. **3)** Membrana revelada para detectar YgaU. FP: Fracción periplásmica; FC: Fracción citosólica; FM: Fracción de membrana. En cada carril se especifica si corresponde a la cepa SDu5 o SEn 83/10. Extracto SDu5 ygaU:FLAG: Extracto proteico total obtenido de la cepa SDu5 ygaU::FLAG crecida en condiciones GMC utilizado como control positivo. Extracto SDu5 salvaje: Extracto proteico total obtenido de la cepa SDu5 salvaje crecida en condiciones GMC utilizado como control negativo.

#### 4.6 Puesta a punto de la localización subcelular mediante microscopía confocal de fluorescencia

Se determinó la localización subcelular de DnaK en cepas salvajes crecidas en condiciones GMC mediante microscopía confocal de fluorescencia (*figura 8*). Mediante la detección de esta proteína de localización conocida pusimos a punto la técnica de preparación de las muestras para observarlas al microscopio confocal. En el paso de permeabilización se probaron diferentes concentraciones de Lisozima obteniendo mejores resultados con una concentración de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se tiñó el ADN con DAPI el cual se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina, y que emite luz azul al ser excitado con un láser de longitud de onda 358nm. Para la detección de DnaK se utilizó como anticuerpo secundario  $\alpha$ -mouse IgG conjugado a FITC que es un fluorocromo con un pico máximo de absorción en 492 nm y que emite luz verde.

De la observación de estos preparados podemos decir que las bacterias fueron fijadas y permeabilizadas exitosamente ya que tanto el DAPI (*figura 8b*) como el anticuerpo  $\alpha$ -mouse IgG conjugado a FITC (*figura 8c*) se encuentra dentro de las bacterias y que éstas no perdieron su forma debido al tratamiento con lisozima (*figura 8a*). DnaK se pudo visualizar correctamente mediante esta técnica.



**Figura 8.** Inmunolocalización de la proteína DnaK en cepas SDu5 *ygaU:FLAG* mediante microscopía confocal de fluorescencia. (a) Imagen de campo claro. (b) La muestra fue excitada con láser de 358 nm para observar el ADN teñido con DAPI. (c) La muestra fue excitada con láser de 492 nm para observar el fluorocromo FITC conjugado al anticuerpo secundario y por ende a DnaK.

#### 4.7 Determinación de la localización subcelular de YgaU mediante microscopía confocal de Fluorescencia

Nos propusimos determinar la localización subcelular de YgaU mediante microscopía confocal de fluorescencia utilizando las cepas etiquetadas SDu5 *ygaU:FLAG* y SEn 83/10 *ygaU:FLAG* crecidas en medio GMC, para lo cual las bacterias se fijaron y permeabilizaron, y se trataron con el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG. Como anticuerpo secundario se utilizó  $\alpha$ -Rat IgG conjugado a Alexa fluor 555 que es un fluorocromo que produce una emisión de luz de color naranja al excitarlo con un láser de longitud de onda 555nm. El ADN fue teñido con DAPI.

Como controles negativos se utilizaron las cepas etiquetadas pero incubadas solo con el anticuerpo secundario (sin anticuerpo primario) (**figura 10**). También se utilizó una cepa salvaje de cada serovar crecida en condiciones GMC y tratada con los anticuerpo  $\alpha$ -FLAG y  $\alpha$ -Rat IgG conjugado a Alexa fluor 555 como un control negativo del etiquetado (datos no mostrados). Como control positivo realizamos un preparado para detectar DnaK y efectivamente obtuvimos una buena señal.

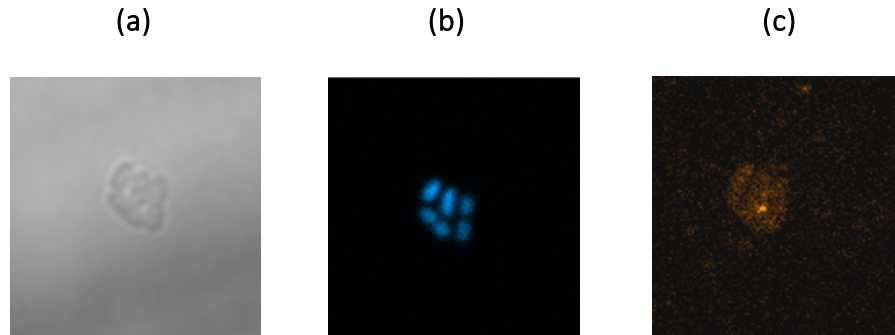
No obtuvimos una señal lo suficientemente intensa del fluorocromo Alexa fluor 555 como para dilucidar la localización subcelular de YgaU por este método (**figura 9 c**). Además en el control negativo (sin anticuerpo primario) (**figura 10 c**) observamos que existe una emisión en el naranja, que puede derivarse de una fluorescencia intrínseca de la bacteria o a interacciones indeseadas del anticuerpo secundario con el preparado. Tuvimos que aumentar al máximo la sensibilidad de detección para obtener una señal aceptable. Es posible que la concentración de YgaU sea baja lo que no nos permite detectarla con esta técnica. Inducir la sobreexpresión de *ygaU* etiquetado mediante un vector de expresión introducido en las bacterias podría ser una alternativa para resolver este problema.

Otra posibilidad es que YgaU en su conformación nativa se pliegue de forma tal que el epítipo FLAG quede oculto e inaccesible para el anticuerpo primario, lo que no solo dificulta la visualización por inmunomicroscopía confocal sino que también sería un problema para los futuros ensayos de inmunoprecipitación. Con el propósito de ahondar un poco más en esta hipótesis se realizó una predicción del plegamiento tridimensional de YgaU con la cola de 3xFLAG en el extremo C-terminal a partir de la predicción 3D de la proteína YgaU de *Salmonella Typhimurium* (**figura 11**). Según esta predicción la cola 3xFLAG se dispondría hacia el exterior siendo accesible por el anticuerpo, aunque justo en esa región el nivel de confianza de la predicción es bajo. Cabe destacar que el Western Blot en el que se pudo detectar YgaU mediante el anticuerpo  $\alpha$ -FLAG se realizó en presencia de altas concentraciones de detergentes que provocan que las proteínas se encuentren desnaturalizadas, por lo que no tuvimos problemas de esta índole.

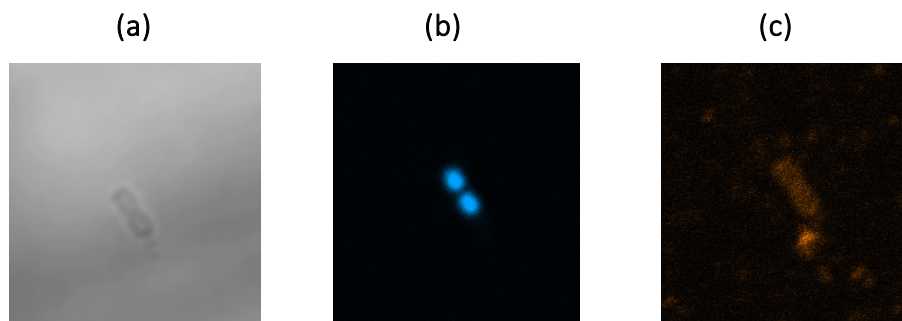
YgaU podría estar implicada en el mantenimiento de la envoltura celular frente al estrés. La envoltura funciona como una barrera de permeabilidad contra antibióticos y protege a la bacteria de detergentes y del estrés ambiental. Algunos factores de virulencia cumplen funciones de mantenimiento en la integridad de la membrana externa o de la pared celular. En *E. coli*, se ha visto que *ygaU* se sobreexpresa al inducir la vía Cpx de respuesta a estrés de la envoltura que detecta proteínas mal plegadas en el periplasma, y que la regulación podría ser directa mediante el regulador de respuesta CpxR del operón *cpxRA* [29].

El sitio de unión a CpxR se encuentra aguas arriba a un gen denominado *yqaE* que codifica una proteína de función desconocida predicha como una proteína de membrana de la familia PMP3, que a su vez se encuentra aguas arriba del gen *ygaU*, tanto en *E. coli* como en *Salmonella enterica*. Se sugiere que estos dos genes se transcriben como una sola unidad en condiciones en las que se induce la vía Cpx. Se observó que los niveles de expresión de ambos genes se elevan de forma similar en estas condiciones.

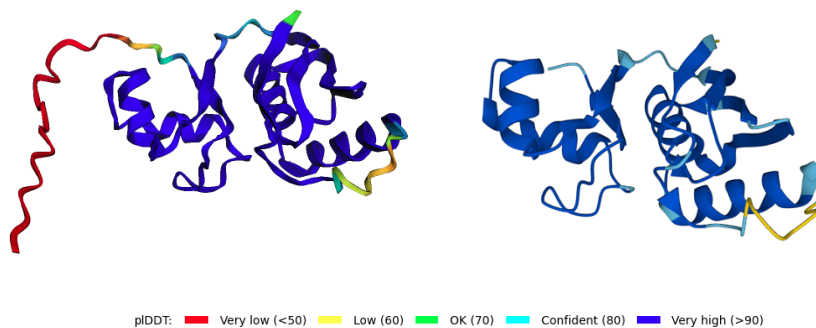
Por lo tanto, YgaU podría estar implicada en el mantenimiento de la envoltura celular frente al estrés al modificar el peptidoglicano que es el componente estructural de la pared celular bacteriana la cual es fundamental para dar forma a la célula y para soportar altas presiones osmóticas.



**Figura 9.** Inmunolocalización de la proteína YgaU en cepas SDu5 *ygaU:FLAG* mediante microscopía confocal de fluorescencia. (a) Imagen de campo claro. (b) ADN teñido con DAPI excitando con láser de 358 nm. (c) Localización de YgaU excitando con láser de 555 nm para observar el fluorocromo Alexa fluor 555.



**Figura 10.** Control negativo de la inmunolocalización de la proteína YgaU en cepas SDu5 *ygaU:FLAG* mediante microscopía confocal de fluorescencia. (a) Imagen de campo claro. (b) ADN teñido con DAPI excitando con láser de 358 nm. (c) Se excitó la muestra con láser de 555 nm para observar el fluorocromo Alexa fluor 555.



**Figura 11.** Predicción de la estructura tridimensional de la proteína YgaU. A la derecha: predicción original de YgaU (UniProt Q8ZML9). A la izquierda: predicción de la proteína YgaU con el agregado de la cola 3xFLAG mediante el programa AlphaFold2.

## 5. Conclusiones y perspectivas

El etiquetado molecular de la proteína YgaU en cepas de *Salmonella* por fusión de su secuencia codificadora a la secuencia codificadora de 3 copias en tándem del epítipo FLAG (3xFLAG) fue exitoso y nos permitió detectar a YgaU por medio de métodos inmunológicos.

Mediante Western Blot de las fracciones subcelulares de *Salmonella* Dublin y Enteritidis podemos concluir que la proteína de función desconocida YgaU se localiza en la membrana.

No pudimos visualizar la localización subcelular de YgaU por inmunofluorescencia y microscopía confocal debido a problemas que pueden deberse a varias razones como el plegamiento tridimensional de la proteína, su abundancia en la célula o problemas en el preparado de las muestras para la microscopía. Resta realizar algunas estrategias y/o modificaciones en el protocolo para lograr cumplir con este objetivo.

Finalmente, el etiquetado molecular de esta proteína permitirá en el futuro identificar posibles interacciones de YgaU con otras proteínas mediante la técnica de inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas.

## 6. Referencias:

- [1] 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, A Data Synthesis', *PLoS Medicine*, 12(12), pp. 1-21. doi:10.1371/journal.pmed.1001940
- [2] 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
- [3] Collins, J.P. *et al.* (2022) 'Preliminary Incidence and Trends of Infections Caused by Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2021'. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2022, 71, Pp. 1260–1264. doi:10.15585/mmwr.mm7140a2
- [4] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. 'The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022, 20(12), Pp. 7666-8273. doi:10.2903/j.efsa.2022.7666
- [5] CDC Yellow Book 2024 Salmonellosis, Nontyphoidal <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>
- [6] Cheng, R.A. *et al.* (2019) 'Embracing Diversity: Differences in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to the Success of Nontyphoidal *Salmonella* as a Foodborne Pathogen'. *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1-20. doi:10.3389/fmicb.2019.01368.
- [7] Grimont, P. and Weill, F. (2007) 'Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*', *Institute Pasteur*, pp. 1-166
- [8] Brenner, F.W. *et al.* (2000) '*Salmonella* nomenclature', *Journal of Clinical Microbiology*, 7, Pp. 2465-2467. doi:10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000.
- [9] McQuiston, J.R. *et al.* (2004) 'Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *fliA* from *Salmonella*', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), Pp. 1923-1932. doi:10.1128/JCM.42.5.1923-1932.2004.
- [10] CDC Yellow Book 2024. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/typhoid-and-paratyphoid-fever>

- [11] 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.
- [12] 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(10), pp. 1624-1637, doi:10.1101/gr.077404.108.
- [13] Winter, S.E. *et al.* (2010) 'The blessings and curses of intestinal inflammation'. *Cell Host & Microbe*, 8(1), pp. 36-43. doi:10.1016/j.chom.2010.06.003.
- [14] Haraga, A. *et al.* (2008) 'Salmonellae interplay with host cells'. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), pp. 53-66. doi:10.1038/nrmicro1788.
- [15] Rivera-Chávez, F. and Bäumlner, A.J. (2015) 'The Pyromaniac Inside You: *Salmonella* Metabolism in the Host Gut'. *Annual Reviews of Microbiology*, 69, pp. 31-48. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104108.
- [16] 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.
- [17] 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*, 66(3), pp. 373–395. doi:10.1128/MMBR.66.3.373.
- [18] 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.
- [19] Betancor, L. *et al.* (2012) 'Genomic Comparison of the Closely Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin'. *The Open Microbiology Journal*, 6, pp. 5-13. doi:10.2174/1874285801206010005.
- [20] Langridge, G.C. *et al.* (2012) 'Invasive Salmonellosis in Humans', *EcoSal Plus*, 5(1), doi:10.1128/ecosalplus.8.6.2.2.
- [21] Martinez-Sanguiné, A.Y. *et al.* (2021) '*Salmonella enterica* Serovars Dublin and Enteritidis Comparative Proteomics Reveals Differential Expression of Proteins Involved in Stress Resistance, Virulence, and Anaerobic Metabolism', *Infection and immunity*, 89(3), doi:10.1128/IAI.00606-20.



- [22] 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). doi:10.1038/s41598-017-02362-3.
- [23] 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.
- [24] Bateman, A. and Bycroft, M. (2000) 'The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD)', *Journal of Molecular Biology*, 299, pp. 1113-1119. doi:10.1006/jmbi.2000.3778.
- [25] Bryant, J. A. *et al.* (2020) 'Structure of dual BON-domain protein DolP identifies phospholipid binding as a new mechanism for protein localisation', *eLife*, 9. doi:10.7554/eLife.62614.
- [26] 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. doi:10.1186/1471-2180-13-294.
- [27] Chaudhuri, R.R. *et al.* (2013) 'Comprehensive Assignment of Roles for *Salmonella* Typhimurium Genes in Intestinal Colonization of Food-Producing Animals'. *PLoS Genet*, 9(4): e1003456. doi:10.1371/journal.pgen.1003456
- [28] Ashraf, K.U. *et al.* (2016) 'The potassium binding protein Kbp is a cytoplasmic potassium sensor', *Structure*, 24, pp. 741–749. doi:10.1016/j.str.2016.03.017.
- [29] Bernal-Cabas, M. *et al.* (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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Uzzau, S. *et al.* (2001). 'Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, pp. 15264-15269. doi:10.1073/pnas.261348198.

- [33] Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000). 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, pp. 6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.
- [34] Thein, M. *et al.* (2010) 'Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies', *Journal of Proteome Research*, 9(12), pp. 6135-6147. doi:10.1021/pr1002438.
- [35] Addinall, S.G. *et al.* (1996) 'FtsZ ring formation in fts mutants', *Journal of Bacteriology*, 178(13), pp. 3877-3884. doi:10.1128/jb.178.13.3877-3884.1996.
- [36] Jumper, J. *et al.* (2021) 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596, pp. 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [37] el Yaagoubi, A. *et al.* (1994) 'Localization of DnaK (chaperone 70) from *Escherichia coli* in an osmotic-shock-sensitive compartment of the cytoplasm', *Journal of Bacteriology*, 176(22), pp. 7074-7078. doi:10.1128/jb.176.22.7074-7078.1994
- [38] Macnab, R.M. (2004) 'Type III flagellar protein export and flagellar assembly', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1693, pp. 207-217. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.04.005.
- [39] Hayashi, F. *et al.* (2001) 'The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5', *Nature*, 410, pp. 1099–1103. doi:10.1038/35074106.
- [40] Zhao, Y. *et al.* (2011) 'The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus', *Nature*, 477, pp. 596–600. doi:10.1038/nature10510.
- [41] Zeng, H. *et al.* (2003) 'Flagellin Is the Major Proinflammatory Determinant of Enteropathogenic *Salmonella*', *The Journal of Immunology*, 171(7), pp. 3668-3674. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3668.
- [42] 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.