



Facultad de Biología
Departamento de Genética
Grado en Biología



Análisis de la expresión de las islas de patogenicidad 1 y 2 a nivel de bacterias individuales en *Salmonella enterica*

Trabajo Fin de Grado

Julia Jiménez-Espadafor Sardón

Tutores:

Roberto Balbontín Soria

Francisco Ramos Morales

Sevilla, junio 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistemas de secreción en <i>Salmonella</i>	2
1.1.1. Sistema de secreción tipo III.....	3
1.2. Expresión génica de las islas.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Bacterias, medios de cultivo y cebadores utilizados en las PCRs.....	7
3.1.1. Bacterias utilizadas	7
3.1.2. Medios de cultivo.....	8
3.2. Construcción de estirpes portando las dos fusiones reporteras en fondo silvestre (RB1436) y mutante (RB1437)	9
3.2.1. Construcción de RB1432 y RB1433	9
3.2.2. Construcción de RB1434 y RB1435	11
3.2.3. Construcción de RB1436 y RB1437.....	12
3.3. Construcción de estirpes RB1440, RB1441, RB1442 y RB1443	12
3.4. Análisis por citometría de flujo.....	13
3.4.1. Bacterias y medios de cultivo utilizados en los análisis por citometría de flujo <i>ex vivo</i>	13
3.4.2. Análisis <i>in vivo</i> (células HeLa).....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Comprobación de la obtención de estirpes RB1432 y RB1433.....	16
4.2. Expresión de las islas de patogenicidad en experimentos <i>ex vivo</i>	19
4.3. Expresión de las islas de patogenicidad en experimentos <i>in vivo</i>	23
5. CONCLUSIONES.....	27
5.1. Posible significado biológico de los resultados obtenidos	27
Bibliografía	29

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es un género de bacterias gram-negativas anaeróbicas facultativas de la familia Enterobacteriaceae que incluye dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* está formada por 6 subespecies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* y un total 2.659 serovares, que se clasifican como tifoideos y no tifoideos (NTS). Los primeros se definen como especialistas, son capaces de infectar y colonizar un pequeño conjunto de hospedadores y entre ellos destacan Typhi, Sendai y Paratyphi, que están altamente adaptados a humanos y son los principales agentes causantes de la fiebre tifoidea. Por el contrario, los NTS son generalistas, tienen una amplia gama de hospedadores, a los que suelen causar diarrea, y se relacionan con enfermedades sistémicas en otras especies animales además de la humana. Como serovares NTS destacan Typhimurium y Enteritidis por su importancia epidemiológica (Ferrari, *et al.*, 2019). En concreto, el serovar Typhimurium causa gastroenteritis en humanos y una enfermedad sistémica similar a la fiebre tifoidea en ratones (Ramos-Morales, 2012).

La patogenicidad de *S. enterica* viene determinada fundamentalmente por genes de virulencia que a menudo se localizan conjuntamente en largas regiones cromosómicas adquiridas por transferencia horizontal llamadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). Las islas de patogenicidad están presentes en un gran número de organismos patógenos y su adquisición permite a las bacterias ganar funciones complejas necesarias para la patogénesis de otras especies (Hensel, 2004). La virulencia del género *Salmonella* parece haber evolucionado en tres fases, empezando con la adquisición de la isla de patogenicidad 1 (SPI 1) por transferencia horizontal génica. La SPI 1 está presente en todos los linajes filogenéticos del género *Salmonella*, pero ausente en *Escherichia coli*, por lo que, debió ser adquirida por un linaje ancestral común a todos los serotipos de *Salmonella*. La SPI 1 contiene genes que codifican factores de virulencia que median mecanismos usados por los serotipos de *Salmonella* durante la fase de infección intestinal, como la invasión de células intestinales epiteliales, la inducción del reclutamiento de neutrófilos y la secreción de fluidos intestinales (J. Bäumler, *et al.*, 1998). Además, la **SPI 1 codifica el sistema de secreción de tipo 3 de la isla 1 (T3SS1)**, que media la translocación dependiente de contacto de un conjunto de proteínas efectoras hacia células eucariotas hospedadoras. Uno de los subconjuntos de las proteínas efectoras de SPI 1 median la invasión de células no fagocíticas por *Salmonella*, un proceso en el que se

modifica el citoesqueleto de actina. Hay otro subconjunto que se asocia con la enteropatogénesis, causando inflamación del epitelio intestinal y diarrea (Hensel, 2004).

La segunda fase está determinada por la generación de dos linajes que divergieron entre sí durante la evolución, dando lugar a las especies *S. bongori* y *S. enterica*. La formación de estas dos especies dentro de *Salmonella* estaría asociada principalmente a una evolución divergente en su virulencia, por la adquisición de nuevos determinantes de virulencia mediante transferencia génica horizontal. Solo los serotipos correspondientes a *S. enterica* presentan la conocida como **isla de patogenicidad 2 (SPI 2)** (J. Bäumler, *et al.*, 1998), **que codifica el T3SS de la isla 2 (T3SS2)** y se activa durante la fase de infección intracelular (Hensel, 2004).

Por lo tanto, los efectores codificados en la SPI 1 median la invasión de las células hospedadoras, lo cual va seguido de la replicación intracelular y supervivencia de *Salmonella*, gracias a los genes codificados en la SPI 2 (Pérez-Morales, *et al.*, 2017).

La última fase evolutiva del género *Salmonella* hace referencia a los distintos grupos filogenéticos que han surgido a partir de *S. enterica*, que son considerados subespecies. La formación del grupo *S. enterica* subgrupo I supuso un aumento en el número de hospedadores que podían infectar, pues mientras *S. bongori* y *S. enterica* subespecies II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII se relacionan principalmente con vertebrados de sangre fría, el subgrupo I tiene la capacidad de infectar aves y mamíferos (J. Bäumler, *et al.*, 1998).

1.1. Sistemas de secreción en *Salmonella*

Para secretar proteínas, como toxinas y enzimas hidrolíticas, al medio extracelular, las bacterias gram-negativas las transportan a través de las dos membranas de la envoltura celular. Existen diferentes sistemas de secreción para ello, que son capaces de reconocer sus sustratos y de facilitar la secreción sin alterar la función de barrera de la envoltura celular (Koster, *et al.*, 2000). Se conocen diferentes tipos que median la exportación. Los sistemas de secreción T1SS, T3SS, T4SS y T6SS utilizan un mecanismo de un solo paso, donde los sustratos son transportados directamente desde el citoplasma bacteriano al espacio extracelular. Por el contrario, los sistemas de secreción que abarcan la membrana externa (T5SS) y el sistema T2SS, utilizan un mecanismo de secreción en dos pasos, donde los sustratos son primero translocados al espacio periplasmático mediante transportadores de la membrana interna (Costa, *et al.*, 2015). En el caso de *S. enterica*, su virulencia se basa en el sistema de secreción de tipo III (T3SS), también conocido como

inyectisoma, que está codificado en las islas de patogenicidad antes mencionadas (Jennings, *et al.*, 2017).

1.1.1. Sistema de secreción tipo III

Los T3SS son complejos que tienen la capacidad de inyectar proteínas efectoras directamente al interior de células hospedadoras. Esto permite a las bacterias gram-negativas modular las respuestas de las células hospedadoras, teniendo la capacidad de alterar sus funciones celulares. T3SS abarca tres membranas celulares: la interna y externa de la bacteria y la de la célula eucariota hospedadora, y presenta alrededor de 20 proteínas que están relacionadas evolutivamente con el sistema de exportación flagelar. Su estructura está dividida en tres segmentos que comprenden componentes extracelulares, el cuerpo basal (que atraviesa las dos membranas de la envoltura celular de la bacteria gram-negativa), y los componentes citoplasmáticos de la membrana interna periférica (fig. 1). El segmento extracelular, que sirve para el paso de proteínas, se conoce como filamento en forma de aguja y constituye un conducto de secreción desde lo alto de la varilla interior hasta el interior de la célula hospedadora. Está formado por dos estructuras: una aguja, que se conecta al cuerpo basal, y un poro de translocación, que se conecta con la membrana de la célula eucariota. El cuerpo basal consiste en una serie de elementos contenidos en las membranas interna y externa bacterianas. Se forma por dos anillos internos concéntricos, conectados a dos anillos externos por una estructura llamada cuello. Para la secreción de los efectores es necesario el aparato de exportación, que está contenido en el cuerpo basal. Entre los componentes citoplasmáticos de la membrana interna periférica se hallan el anillo citoplasmático (anillo-C) y el complejo ATPasa, que comparte homología con una de las proteínas que componen la ATPasa flagelar (Dos Santos, *et al.*, 2020).

El ensamblaje de T3SS es complejo y está sujeto a una regulación por proteínas, cuya síntesis sigue una estricta y jerárquica producción (Dos Santos, *et al.*, 2020). Los sustratos para T3SS están mayoritariamente codificados fuera de las islas de patogenicidad (aunque algunos también dentro de ellas), normalmente dentro de segmentos de ADN que presentan características indicativas de adquisición horizontal (Ramos-Morales, 2012).

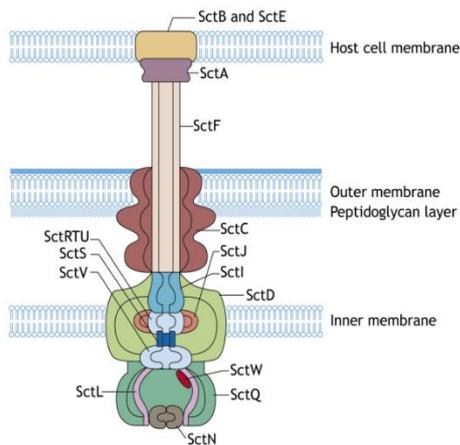


Figura 1. Representación de la estructura del T3SS. Las proteínas que constituyen cada estructura están denominadas siguiendo la nomenclatura Sct (*Secretion and Cellular Translocation*), prefijo que se usa para designar a todas las proteínas relacionadas con T3SS. La aguja extracelular está formada por SctF y se conecta al cuerpo basal por otra proteína, SctI. SctA forma un complejo en lo alto de la aguja. SctE y SctB son translocadores que se secretan tras la formación del poro para anclarse a SctA, donde ejercen su función. Los anillos de la membrana interna están formados por SctJ y SctD y los anillos de la membrana externa por SctC. El aparato de exportación está formado por cinco proteínas de membrana: SctR, SctS, ActT, SctU y SctV. El anillo-C lo constituye la proteína SctQ. El complejo ATPasa necesita de la proteína SctO para acceder a la célula epitelial y de SctL para estabilizar a la principal proteína que lo compone, SctQ. Por último, el resto de proteínas se relacionan con la regulación de T3SS, como SctP (controla la longitud de la aguja) y SctU y SctW (regulan la jerarquía de secreción) (Dos Santos, *et al.*, 2020).

El **T3SS1** actúa en los primeros momentos de la invasión y se activa cuando contacta con células del epitelio del hospedador infectado, formándose un poro en la membrana de la célula eucariota que le permite translocar efectores a través de la membrana plasmática de la célula hospedadora (Dos Santos, *et al.*, 2020; Ramos-Morales, 2012). Dichos efectores modifican el citoesqueleto de las células no fagocíticas y dan lugar a la formación de los llamados *ruffles*, protusiones de membrana ricas en actina. Estos permiten que la bacteria sea englobada en la célula hospedadora, además de estabilizar las vacuolas que contienen *Salmonella* (SCV) que se forman tras su internalización (Dos Santos, *et al.*, 2020). También desempeñan otras funciones como desencadenar la activación de la vía MAPK (Proteína Quinasa Activada por Mitógeno), producir citoquinas proinflamatorias, reclutar PMNs (Leucocitos Polimorfonucleares) e inducir la inflamación intestinal (Dos Santos, *et al.*, 2020). Además, algunos efectores evitan la apoptosis de las células hospedadoras, lo cual prolonga el mantenimiento de la invasión (Dos Santos, *et al.*, 2020; Ramos-Morales, 2012). Todo ello proporciona un ambiente favorable a la bacteria, que tiene la capacidad de utilizar la etanolamina como fuente de carbono al inducir en el intestino del hospedador la producción de tetrionato, que *Salmonella* es capaz de respirar. Esto sitúa a *Salmonella* en una situación ventajosa frente a las bacterias de la microbiota intestinal del hospedador (Thiennimitr, *et al.*, 2011).

El sistema **T3SS2** se expresa intracelularmente como respuesta a un pH ácido y deficiencia de nutrientes, condiciones características del lumen de la SCV. Gracias a esta estructura se produce la translocación de efectores desde el medio intracelular bacteriano al citoplasma de la célula hospedadora a través de su membrana. Estos efectores se utilizan para modular el medio intracelular (Ramos-Morales, 2012). En el interior de la SCV, los efectores evitan la formación de fagolisosomas y manipulan en tráfico y la

maduración de la SCV, al mismo tiempo que promueven la supervivencia y replicación de *Salmonella* (Dos Santos, *et al.*, 2020).

T3SS1 y T3SS2 no son completamente independientes entre sí, pues, aunque se activen en fases diferentes de la invasión, se ha observado que mutaciones que afectan al T3SS2 provocan una disminución de la expresión de genes de T3SS1, y por lo tanto, de la capacidad de la bacteria para invadir células (Dos Santos, *et al.*, 2020). También se han descrito diferentes interacciones a nivel de regulación, como mecanismos transcripcionales cruzados entre las islas, donde uno de los reguladores codificados por la SPI 1, HilD, regula, en la fase estacionaria de crecimiento en medio LB, la expresión de los regulones de SPI 1 y SPI 2 (Bustamante, *et al.*, 2008).

1.2. Expresión génica de las islas

Existen estudios acerca de la expresión génica de SPI 1 tanto a nivel de células individuales como a nivel de población, que indican que existe una activación diferencial y jerárquica de los promotores de los genes reguladores de SPI 1 (P_{hilC} , P_{hilD} y P_{rtsA}) en células individuales de una población. Además, habría una transición heterogénea en la que subgrupos de células tendrían dichos promotores en estado activo (“*on*”) o inactivo (“*off*”). Esto indica que existe una heterogeneidad fenotípica en la expresión de SPI 1, una expresión biestable (Saini, *et al.*, 2010; Hautefort, *et al.*, 2003; Sánchez-Romero & Casadesús, 2021; Bossi, *et al.*, 2019; Figueroa-Bossi, *et al.*, 2022; Sánchez Romero & Casadesús, 2018).

A pesar de las investigaciones acerca de la expresión de las islas, parece no haber literatura referente al patrón de expresión simultánea de SPI 1 y SPI 2 a nivel de células individuales, por lo que, se desconoce si ambas se activan en la misma subpoblación, en diferentes, o cuál es la dinámica reguladora de ambas islas a nivel de célula individual. Para abordar estas cuestiones, en este proyecto se utilizan dos fusiones reporteras a proteínas fluorescentes, una verde y otra roja. La proteína verde fluorescente (*sfGFP*) se encuentra fusionada al promotor del gen *sicA* de SPI 1, y la construcción está insertada en el locus pseudogenizado *malXY*; se trata de una construcción que existía previamente en el laboratorio. El gen *sicA* está codificado en la SPI 1 y se expresa bajo condiciones de activación de la misma. En cuanto a la proteína roja fluorescente (*mCherry*), esta se ha empleado en el presente trabajo para crear una fusión con el promotor del gen *ssaB* de la SPI 2, que está codificado en la SPI 2 y que, según la literatura, presenta un nivel de

expresión alto en condiciones de activación de la SPI 2 y bajo en otras condiciones. Esta construcción se ha insertado en el pseudogén *STM14_2013*. La combinación de ambas fusiones fluorescentes (*P_{sicA}-sfGFP* y *P_{ssaB}-mCherry*) en la misma célula permite estudiar el patrón y la dinámica de expresión de SPI 1 y SPI 2 en células individuales. Además, al estar ambas fusiones en pseudogenes, es altamente improbable que afecten a la viabilidad de la bacteria, y tanto SPI 1 como SPI 2 permanecen intactas, lo cual permite estudiar la expresión de ambas islas en células individuales durante infecciones *in vivo*, que precisan de la expresión de ambas islas para producirse.

La RNasa HI es una ribonucleasa cuya función consiste en la degradación de híbridos ADN-ARN que se forman durante la transcripción conocidos como *R-loops*. Los *R-loops* contribuyen al correcto funcionamiento de la bacteria, sin embargo, un alto número de estos pueden causar el efecto contrario mediante la inhibición de la reparación del ADN, el bloqueo del avance de la horquilla de replicación, generación de conflictos entre la replicación y la transcripción y de roturas de ADN. Por tanto, la RNasa HI es muy importante para la fisiología celular. Además, la ausencia de esta ribonucleasa afecta la expresión de genes asociados con la patogénesis de *Salmonella*. Por ejemplo, datos obtenidos en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo indican que los genes *iagB* (SPI 1), *sseC* y *ssaV* (SPI 2), *pipB2* (translocados por ambos T3SS) y *spvB* (también involucrado en virulencia), muestran patrones de expresión alterados en bacterias mutantes Δ *rnhA* en comparación con los de bacterias silvestres (fig. 2A). Por otra parte, la ausencia de RNasa HI causa defectos en la proliferación de *Salmonella* en el interior de macrófagos (fig. 2B). En base a estos datos, se decidió incluir en este trabajo estirpes mutantes Δ *rnhA* que portan las dos fusiones fluorescentes *P_{sicA}-sfGFP* y *P_{ssaB}-mCherry*, con objeto de estudiar los patrones de expresión de ambas islas de patogenicidad a nivel de células individuales en este fondo genético de interés.

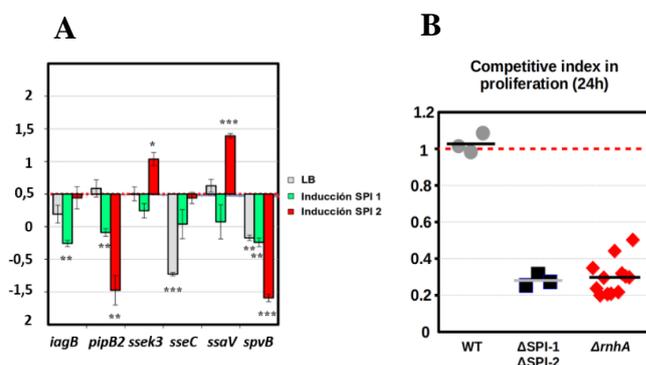


Figura 2. (A) Expresión de fusiones luminiscentes de genes de virulencia en la SPI 1 y la SPI 2 en el fondo mutante Δ *rnhA* con respecto al WT (Balbontín, R. *et al*, no publicado). El gen *iagB* está en la SPI 1, los genes *sseC* y *ssaV* están en la SPI 2, los genes *pipB2* y *sseK3* están en el cromosoma fuera de las SPI 1 y SPI 2 y el gen *spvB* está en el plásmido de virulencia. (B) Competiciones WT vs WT (puntos grises), WT vs mutante con la SPI 1 y la SPI 2 delecionadas (cuadrados negros) y WT vs mutante Δ *rnhA* (rombos rojos) (Balbontín, R. *et al*, no publicado).

2. OBJETIVOS

- Construir una fusión P_{ssaB} - $mCherry$ en el pseudogén $STM14_{2013}$.
- Estudiar el patrón y la dinámica de expresión de SPI 1 y SPI 2 en células individuales, tanto *in vivo* como *ex vivo*.
- Estudiar el efecto de la ausencia de RNasa HI en el patrón y dinámicas de la expresión de SPI-1 y SPI-2, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Bacterias, medios de cultivo y cebadores utilizados en las PCRs

3.1.1. Bacterias utilizadas

Tabla 1. Listado de estirpes utilizadas en este trabajo.

Estirpes	Genotipo	Antibiótico marcador	Referencia
RB178 ¹	$malY::P_{sicA}$ - $sfGFP::FRT$ - aph - $FRT::malX$	KmR	R. Balbontín
RB296 ²	$ysaC::P_{LtetO-1}$ - $mCherry::FRT$ - cat - $FRT::ysaD$	CmR	R. Balbontín
RB300 ²	$ysaC::P_{LtetO-1}$ - $RBSpZA31$ - luc - $sfGFP::FRT$ - cat - $FRT::ysaD$	CmR	R. Balbontín
RB1379 ¹	WT		R. Balbontín
RB1380 ¹	(pKD46)	ApR, ts	R. Balbontín
RB1382 ¹	$\Delta rhnA$		R. Balbontín
RB1432 ¹	$ssaB$ - $mCherry::FRT$ - cat - FRT	CmR	Este trabajo
RB1433 ¹	$STM14_{2013}::P_{ssaB}$ - $mCherry::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	CmR	Este trabajo
RB1434 ¹	$malY::P_{sicA}$ - $sfGFP::FRT$ - aph - $FRT::malX$	KmR	Este trabajo
RB1435 ¹	$\Delta rhnA malY::P_{sicA}$ - $sfGFP::FRT$ - aph - $FRT::malX$	KmR	Este trabajo
RB1436 ¹	$malY::P_{sicA}$ - $sfGFP::FRT$ - aph - $FRT::malX$ $STM14_{2013}::P_{ssaB}$ - $mCherry::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	KmR, CmR	Este trabajo
RB1437 ¹	$\Delta rhnA malY::P_{sicA}$ - $sfGFP::FRT$ - aph - $FRT::malX$ $STM14_{2013}::P_{ssaB}$ - $mCherry::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	KmR, CmR	Este trabajo
RB1440 ¹	$STM14_{2013}::P_{LtetO-1}$ - $sfGFP::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	CmR	Este trabajo
RB1441 ¹	$STM14_{2013}::P_{LtetO-1}$ - $mCherry::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	CmR	Este trabajo
RB1442 ¹	$\Delta rhnA STM14_{2013}::P_{LtetO-1}$ - $RBSpZA31$ - luc - $sfGFP::FRT$ - cat - $FRT::STM14_{2013}$	CmR	Este trabajo

RB1443 ¹	Δ rnhA STM14_2013::P _{LetO-1} - mCherry::FRT-cat-FRT::STM14_2013	CmR	Este trabajo
---------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	-----	--------------

¹*Salmonella* Typhimurium, ²*Escherichia coli*. El fondo genético para las estirpes de *S. enterica* Typhimurium es ATCC 14028s y para las estirpes de *E. coli* es K-12 MG1655.

El organismo de estudio de este trabajo es *Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Typhimurium estirpe 14028. A partir de la construcción presente en la estirpe RB296 se han creado todas las estirpes que presentan una construcción cromosómica con el gen que codifica la proteína fluorescente *mCherry*. En el caso de las bacterias fluorescentes verdes, estas derivan de la construcción presente en la estirpe RB300, que posee una construcción cromosómica que contiene el gen *sfGFP*. Por último, las bacterias mutantes Δ rnhA derivan de RB1382 (tabla 1).

Tabla 2. Listado de cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')
ORB446	acggatgtggtgtgagcgaattgatagaaactcccatttATGGTGAGCAAGGGCGAGG
ORB447	aaatagtaaaattaagattaaacgtttattactaccattGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ORB448	cagcatcctgatattgtacaag
ORB449	catcactctttgctgtattgag
ORB450	gatgccgccagcggagaagaatagttaacaattattactggcAATGCTTCCCTCCAGTTGCC
ORB451	tgtaaattattatcaatagctccattgatcgcgggtctGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ORB452	gttgatggctatattgggatgg
ORB453	gtgattggcctgctgg
ORB454	gtgattggcctgctgg
ORB457	atgccgccagcggagaagaatagttaacaattattactggcGATATCGACGTCTAAGAAACC
ORB459	tgtaaattattatcaatagctccattgatcgcgggtctGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

Los nucleótidos escritos en mayúsculas tienen homología con la secuencia de interés que se amplifica. Los nucleótidos escritos en minúsculas son los (aproximadamente) 40 nucleótidos de homología con el gen en el que se inserta la construcción. Los cebadores ORB446 a ORB454 se utilizaron para la construcción de las estirpes RB1432 y RB1433. Los cebadores ORB457 y ORB459 se usaron para la construcción de RB1440, RB1441, RB1442 y RB1443.

3.1.2. Medios de cultivo

Salvo que se indique lo contrario, todas las bacterias fueron cultivadas en medio LB (Figuroa-Bossi, et al., 2022).

3.2. Construcción de estirpes portando las dos fusiones reporteras en fondo silvestre (RB1436) y mutante (RB1437)

Para crear las estirpes se utilizó la técnica conocida como “*recombineering*” (“recombinación genética”, de *Recombination-mediated Genetic Engineering*), que hace referencia a la ingeniería de ADN recombinante mediante recombinación homóloga. *Recombineering* utiliza sistemas de recombinación codificados por bacteriófagos (como lambda) para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga, permitiendo introducir cambios genéticos *in vivo* en el genoma bacteriano. Esta técnica fue inicialmente desarrollada en *Escherichia coli* por (Datsenko & Wanner, 2000; Murphy, *et al.*, 2000; Anon., 2000), pero es aplicable a otras bacterias como *Salmonella spp.* y *Shigella ssp.* (Marinelli, *et al.*, 2012). La estrategia consiste en reemplazar una secuencia cromosómica por un gen seleccionable de resistencia a antibiótico que se genera por PCR, utilizando cebadores con una homología de 35 a 60 nucleótidos (varía según la especie). De manera que, se puede interrumpir directamente un gen mediante transformación con fragmentos de PCR que codifican un marcador seleccionable (Datsenko & Wanner, 2000).

Posteriormente se llevaron a cabo transducciones utilizando el bacteriófago P22 (Schmieger, 1972) para transferir las construcciones cromosómicas a bacterias receptoras con un fondo genético limpio.

3.2.1. Construcción de RB1432 y RB1433

En primer lugar, se realizó una PCR a partir de colonias de RB296, utilizando los cebadores ORB446 y ORB447, que permiten amplificar la secuencia *mCherry::FRT-cat-FRT*, introduciendo secuencias homólogas al gen *ssaB*. El primero alinea con el inicio de la secuencia codificante de *mCherry* y el segundo aguas abajo del casete de resistencia a cloranfenicol (*FRT-cat-FRT*). Los cebadores presentan una longitud aproximada de 60 nucleótidos, donde los 40 primeros nucleótidos del extremo 5' proporcionan la identidad de secuencia para insertarse en el gen diana, en este caso *ssaB*, y los 20 nucleótidos restantes alinean y amplifican la secuencia del casete. De esta manera, en el paso de transformación, la secuencia amplificada se insertará inmediatamente aguas abajo del promotor del gen *ssaB*, reemplazando la secuencia codificante de dicho gen por el casete *mCherry::FRT-cat-FRT*-. La bacteria receptora, RB1380, porta un plásmido termosensible (pKD46) que codifica las funciones necesarias para favorecer la recombinación homóloga (sistema Lambda-Red). La PCR se hizo en dos pasos: en los 10 primeros ciclos se usa una temperatura de alineamiento que favorece que alineen los 20

nucleótidos del casete *mCherry::FRT-cat-FRT*, mientras que en los 25 ciclos siguientes se eleva la temperatura de alineamiento porque ya alinean los cebadores completos, incluyendo la región de homología con el gen diana en el que la construcción se va a insertar. Se utilizó la polimerasa de alta fidelidad DNA Phusion (New England BioLabs)

A continuación, se realizó la transformación, de manera que, el producto de PCR obtenido (PCR1: RB296 ORB446-ORB447) se insertó aguas abajo del promotor del gen *ssaB* (*P_{ssaB}*). De esta manera, se creó la **estirpe RB1432**.

Para asegurar que la inserción se produjo correctamente, se hizo una PCR de comprobación, utilizando las parejas de cebadores ORB448-ORB449 y ORB448-ORB454. Estos, a diferencia de los que se utilizaron en la PCR1, presentan una longitud aproximada de 20 nucleótidos, pues esta PCR es de un solo paso. La primera pareja posee homología con las secuencias flanqueantes a *ssaB*, por lo que amplifican toda la región de la putativa inserción. ORB454 se une aguas abajo del gen *mCherry*, amplificando su secuencia (junto con ORB448) solo en el caso en el que la inserción se haya producido en la localización correcta.

Para crear RB1433 el procedimiento fue similar, realizando primero una PCR de RB1432, esta vez a partir de ADN genómico, con los cebadores ORB450 y ORB451. Ambos presentan aproximadamente 40 nucleótidos de identidad con el pseudogén *STM14_2013*, el primero aguas arriba y el segundo aguas abajo. Los 20 nucleótidos se corresponden, para ORB450, con la región aguas arriba de *P_{ssaB}*, mientras que ORB451 se une a la secuencia aguas abajo de la FRT. De esta manera, se amplifica la secuencia *P_{ssaB}-mCherry::FRT-cat-FRT*, introduciendo regiones flanqueantes homólogas a *STM14_2013*. Este producto de PCR (PCR2: RB1432 ORB450-451) se insertará mediante transformación en RB1380, originando así la **estirpe RB1433**.

Para garantizar que la inserción fue correcta, se realizó una PCR con dos pares de cebadores: ORB452-ORB453 y ORB452-ORB454. ORB452 hibrida aguas arriba del gen *STM14_2013* y ORB453 alinea aguas abajo del mismo. Como se ha mencionado, ORB454 alinea aguas abajo de la secuencia de *mCherry*. La pareja de cebadores ORB452-ORB454 permite saber si se ha producido una inserción en *STM14_2013*, y la pareja ORB452-ORB454 que *mCherry* se encuentra en la localización y orientación adecuadas, permitiendo además secuenciar el producto de PCR para asegurar que las

secuencias nativas del promotor P_{ssaB} y de *mCherry* se han conservado completamente durante el proceso de construcción de la fusión fluorescente.

3.2.2. Construcción de RB1434 y RB1435

Inicialmente se llevaron a cabo dos transducciones: RB1434 (RB1379 x RB178) y RB1435 (RB1382 x RB178) para generar estirpes silvestre y mutante $\Delta rnhA$ que porten la fusión P_{sicA} -*sfGFP*. Para ambas estirpes la bacteria donadora fue RB178 por lo que, tras la transducción, las bacterias receptoras incluyeron en su genoma el gen de fluorescencia verde *sfGFP*, bajo el control del promotor P_{sicA} de la SPI 1, aguas abajo del cual se localiza el gen de resistencia a kanamicina, *aph*. Toda la construcción se encuentra insertada entre los pseudogenes *malX* y *malY* (tabla 1). Para realizar las transducciones se preparó un lisado de P22 con la estirpe donadora, RB178 y luego se mezcló, en dos tubos diferentes, con RB1379 y RB1382, respectivamente. Las mezclas se incubaron con agitación a 37°C durante 30 minutos y se sembraron en placas de Petri con LB suplementado con kanamicina. A continuación, se realizaron 4 siembras sucesivas en medios diferentes, primero para aislar las colonias libres de fago y luego para descartar a los pseudolisógenos, bacterias con genomas circulares de fagos que pueden replicarse mediante círculo rodante y después permanecer en las poblaciones bacterianas. El procedimiento fue el siguiente: se aislaron 6 colonias de cada estirpe en dos placas distintas con LB suplementado con kanamicina y se incubaron toda la noche (O/N, del inglés “*overnight*”) a 37°C. Las 6 colonias de cada estirpe se volvieron a sembrar en placas similares a las anteriores, pero que además contenían EGTA, un quelante del calcio y magnesio que evita la adsorción de P22 a la membrana bacteriana, para evitar reinfecciones de P22 en la placa. De esta manera se eliminan los fagos de las colonias bacterianas. Posteriormente se incubaron O/N a 37°C. Se volvieron a aislar los transductantes, esta vez en una placa y con medio EBU. Este permite visualizar las colonias donde las bacterias se están lisando, pues al verterse el contenido de su citoplasma al exterior, el bajo pH del mismo desencadena una reacción que causa que uno de los colorantes que contiene el medio precipite, originando un color azul. Las colonias en las que no hay lisis son de color blanco. A continuación, se incubaron O/N a 37°C. Se hizo una última siembra en la que se realizó un *cross-streaking*, donde, utilizando un fago P22 hiperlítico (H5) se incubaron los transductantes O/N a 37°C, lo que permitió descartar así a las bacterias pseudolisógenas.

3.2.3. Construcción de RB1436 y RB1437

Para obtener estas estirpes las traducciones realizadas fueron: RB1436 (RB1434 x RB1433) y RB1437 (RB1435 x RB1433). El procedimiento es similar al explicado en la sección 3.2.2., aunque en esta ocasión la bacteria donadora es RB1433, que como se ha descrito anteriormente porta el gen de fluorescencia roja *mCherry* bajo el control del promotor *P_{ssaB}* de la isla 2, aguas abajo del cual se localiza el gen de resistencia a cloranfenicol, *cat*; toda la construcción se encuentra insertada en el pseudogén *STM14_2013*. Como la resistencia en este caso es cloranfenicol, las placas con LB se suplementaron con dicho antibiótico. Las bacterias receptoras ya son resistentes a kanamicina, por tanto, las estirpes resultantes de la transducción poseen el gen *aph* y el gen *cat* y son resistentes a ambos antibióticos. Estas bacterias, además, poseen la fusión entre la SPI 1 y la SPI 2, teniendo así, fluorescencia verde (*sfGFP*) y roja (*mCherry*). Por otra parte, la bacteria RB1437 es mutante Δ *rnhA* (tabla 1), mientras que RB1436 es silvestre.

3.3. Construcción de estirpes RB1440, RB1441, RB1442 y RB1443

Estas bacterias se construyeron siguiendo el mismo procedimiento que en las estirpes anteriores. En las PCR para crear RB1440, RB1441, RB1442 y RB1443 se utilizaron la misma pareja de cebadores, ORB457-ORB459, que permite amplificar las construcciones *P_{LtetO-1}-sfGFP::FRT-cat-FRT* y *P_{LtetO-1}-mCherry::FRT-cat-FRT*, de RB300 y RB296, respectivamente, introduciendo secuencias flanqueantes homólogas a *STM14_2013*. Posteriormente, para tener las construcciones en fondos genéticos limpios silvestre y mutante Δ *rnhA*, se realizaron las siguientes transducciones: RB1440 (RB1379 x RB1440), RB1441 (RB1379 x RB1441), RB1442 (RB1382 x RB1442) y RB1443 (RB1382 x RB1441). Las estirpes RB1440 y RB1442 expresan constitutivamente el gen *sfGFP*, mientras que RB1441 y RB1443 expresan constitutivamente el gen *mCherry*.

Estas estirpes se usarán como controles positivos de expresión de fluorescencia en los ensayos de citometría de flujo. RB1440 y RB1441 son controles de expresión de *sfGFP* y *mCherry*, respectivamente, en fondo silvestre, para RB1436. Para la estirpe mutante (Δ *rnhA*) RB1437, las bacterias control serán RB1442 y RB1443, la primera como bacteria fluorescente verde y la segunda como roja.

3.4. Análisis por citometría de flujo

El citómetro de flujo se utilizó para monitorear la expresión de las fusiones *sfGFP* y *mCherry*. La adquisición de los datos se realizó con el citómetro MACSQuant® Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) y para analizarlos se usó el programa FlowJo versión 10.8.1.

3.4.1. Bacterias y medios de cultivo utilizados en los análisis por citometría de flujo *ex vivo*

Se analizaron las muestras correspondientes a las estirpes RB1436, RB1437, junto con sus controles: RB1379 y RB1382, como controles negativos de fluorescencia para RB1436 y RB1437, respectivamente; RB1440 y RB1442, como controles positivos de fluorescencia verde para la estirpe silvestre (RB1436) y mutante (RB1437), respectivamente; RB1441 y RB1443, como controles positivos de fluorescencia roja para RB1436 y RB1437, respectivamente.

Para la preparación de las muestras se hicieron cultivos O/N en tres medios distintos: LB, LPM y LB NaCl 0,3 M (tabla 3). En todos los medios se inocularon tres colonias de cada estirpe en 5 ml del medio correspondiente y se dejaron toda la noche incubando a 37°C; las bacterias en LPM y LB con agitación, y las bacterias en LB NaCl 0,3 M en estático, para generar condiciones de microaerobiosis. Al día siguiente se realizaron diluciones de cada estirpe, 1:1000 en el caso de LB y LPM y 1:500 para LB NaCl 0,3 M, en PBS estéril filtrado a través de un filtro con un tamaño de poro 0,22 µm (MF-Millipore™ MCE Membrane) para reducir la presencia de partículas que pudieran interferir con la citometría.

Para cada medio se establecieron una serie parámetros que permitieron medir los niveles de fluorescencia roja y verde. Los canales que se utilizaron fueron: FSC (*forward scatter*), SSC (*side scatter*), mCherry-H (*mCherry-Height*) y sfGFP-H (*sfGFP-Height*). Los voltajes según el medio se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para las bacterias.

Medio	Composición
LPM	0,375g/L de KCl 0,99 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,087 g/L de K ₂ SO ₄ 1 g de casaminutosoácidos 15,6 g/L hidratado 3,45 mL/L de glicerol (0,345%) 1,35 mL del tampón K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ a 250 mM Ajustar a pH 5,8 usando KOH 10M
LB	5 g/L de extracto de levadura 10 g/L triptona 5 g/L de NaCl
LB 0,3 M NaCl	5 g/L de extracto de levadura 10 g/L triptona 17,5 g/L de NaCl

Tabla 4. Voltajes de los canales utilizados según el medio en los análisis por citometría de flujo.

Medios de cultivo	Canales				
		FSC	SSC	mCherry-H	sfGFP-H
LB		730	505	500	490
LB 0,3M NaCl		730	470	510	520
LPM		740	465	530	520

3.4.2. Análisis *in vivo* (células HeLa)

3.4.2.1. Bacterias y medios de cultivo utilizados

En este experimento se llevó a cabo la infección de células epiteliales HeLa con distintos cultivos bacterianos correspondientes a las bacterias RB1436 y RB1437, junto con sus respectivos controles: RB1440 y RB1441 para RB1436; RB1442 y RB1443 para RB1437. Los experimentos *ex vivo* permitieron determinar que las bacterias expresando constitutivamente *mCherry* se comportan como no fluorescentes respecto a *sfGFP*, y viceversa, las *sfGFP* constitutivas se comportan como no fluorescentes para *mCherry*. Eso permitió que, en los experimentos *in vivo*, las estirpes RB1440 y RB1442 pudieran ser usadas simultáneamente como controles positivos para fluorescencia verde y controles negativos para fluorescencia roja y viceversa para las estirpes RB1441 y RB1443. Las bacterias se inocularon en tubos de 10 ml con 5 ml de LB 0,3M NaCl (tabla 3) y se incubaron durante 16h en estático a 37°C.

3.4.2.2. Ensayos de infección bacteriana en células epiteliales HeLa

Las células epiteliales HeLa crecieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 50 mL de suero bovino fetal (inactivado por calor), 2mM de L-glutaminosa y 5 mL de un cóctel antibiótico (60 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). El día previo a la infección, este medio fue retirado, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió 1 mL de una solución de tripsina-EDTA (0.25%-0.02% en PBS). Luego las células se incubaron por 10 minutos a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5% en condiciones de humedad. La tripsina-EDTA permite que las células adheridas entre sí y al fondo de la placa se despeguen. A continuación, se añadieron 9 mL de medio fresco (DMEM suplementado con 50 mL de suero bovino fetal y 2mM de L-glutaminosa) sin antibiótico y se tomaron 10 µL de la suspensión de células para contar su número en una cámara de Neubauer. De esta manera, se estimó el volumen necesario de cultivo celular para que este contuviera 150.000 células/mL, que fue añadido a dos placas de 24 pocillos (una para la estirpe silvestre y otra para la mutante *ArnhA*). Por último, ambas placas se incubaron a 37°C y con CO₂ al 5% en condiciones de humedad toda la noche.

Para la infección de células HeLa con bacterias, primero se estimó el número de bacterias en los cultivos inoculados el día anterior, los cuales se centrifugaron (1 minuto a 13.000 r.p.m) en dos tubos de 2 mL por estirpe. El pellet de cada tubo se resuspendió en 1 mL de DMEM, concentrando los pellets de los dos tubos en uno. A continuación, se hicieron diluciones 1:10 de cada cultivo y se midieron las DO₆₀₀, lo que permitió conocer el número de bacterias por mL. Se prepararon cultivos bacterianos de cada estirpe en 5 mL de medio fresco, que se añadieron a los correspondientes pocillos de cada placa donde previamente habían crecido las células HeLa, para alcanzar una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 100. La infección bacteriana fue monitorizada (ver abajo) a distintos tiempos (30 minutos, 2h, 7h y 24h).

Tras la infección, las placas se incubaron primero 30 minutos a 37°C y CO₂ al 5% y pasado este tiempo el contenido de los pocillos (mezcla de medio de cultivo y bacterias) fue retirado. Las células de todos los pocillos se lavaron dos veces con PBS y luego fue retirado cada vez, salvo a las células de la primera fila de cada placa, que permanecieron con el segundo lavado. Estas representan el tiempo 30 minutos y tampoco se les añadió 1mL de DMEM (suplementado con suero fetal bovino y glutamina suplementada con 100 µg/mL de gentamicina), mientras que a las demás, sí. La gentamicina no puede traspasar

la membrana de las células eucariotas, por lo que solo mata a las bacterias que no han conseguido infectarlas. En ese momento, los pocillos de la primera fila se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. Posteriormente, el PBS del segundo lavado se retiró y se añadieron 100µL de tritón X-100 al 1% (en PBS). El tritón destruye la membrana eucariota sin afectar a las bacterias. Las placas se incubaron durante 10 minutos a 37°C con CO₂ al 5% en condiciones de humedad y pasado este tiempo se añadieron 900µL de PBS 1X filtrado solo a los pocillos del tiempo 30 minutos, para medir las muestras en el citómetro.

Para el resto de los tiempos el procedimiento fue similar, de manera que cada vez, una de las filas permanecía con el segundo lavado de PBS 1X. La mezcla de medio y gentamicina solo se añadió a los 30 minutos y a las 2h, esta última vez a una concentración de 16 µg/mL.

3.4.2.3. Microscopía de fluorescencia

Los pocillos correspondientes a cada tiempo se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Bio-Rad ZOE Fluorescent Cell Imager, permitiendo ver las poblaciones bacterianas bajo luz transmitida, fluorescencia verde y fluorescencia roja. En el caso de las fluorescencias verde y roja los parámetros fueron: 500 ms de exposición, 50 de intensidad LED, contraste 0, ganancia 40. Para la luz transmitida, 300 ms de exposición, 40 de intensidad LED, contraste 0 y ganancia 8.

3.4.2.4. Análisis de muestras por citometría de flujo

Los parámetros utilizados fueron los mismos que los indicados con anterioridad en el apartado 3.4.1. para el análisis de muestras en LB 0,3M NaCl.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comprobación de la obtención de estirpes RB1432 y RB1433

Para comprobar que las secuencias de interés se habían amplificado correctamente (paneles 3A, 3B, 4A y 4B) y, posteriormente, que se habían insertado en las bacterias receptoras con éxito, dando lugar a las estirpes RB1432 (fig. 3E) y RB1433 (fig. 4E), respectivamente, se corrieron las PCR correspondientes en geles de agarosa al 1% (p/v) en un tampón de electroforesis que contiene Tris base (40mM), ácido acético (20mM) y EDTA (1mM) (figuras 3 y 4):

- PCR de comprobación (RB1432 ORB448-ORB449, fig. 3C, pocillos superiores). El tamaño de banda esperado para las 7 muestras fue de 1920 pb, pues el gen *ssaB* está interrumpido por la construcción *mCherry::FRT-cat-FRT*, amplificada en la PCR1. La muestra parental WT (RB1380) presenta un tamaño de banda inferior, 567 pb, pues esta no contiene la construcción.
- PCR de comprobación (RB1432 ORB448-ORB454, fig. 3C, pocillos inferiores). El tamaño de banda esperado fue 850 pb, lo cual se corresponde con la secuencia de *mCherry*. La muestra parental WT (RB1380) no tiene insertada la construcción, por lo que no se visualiza banda.
- PCR de comprobación (RB1433 ORB452-ORB453, fig. 4C1). Las muestras 1-7 tienen un tamaño de banda de 2288 pb, pues se está amplificando toda la construcción *PssaB-mCherry::FRT-cat-FRT* amplificada en la PCR2, insertada en el pseudogén *STM14_2013*. La estirpe parental WT (RB1380) no presenta dicho gen interrumpido por la construcción, por lo que el tamaño de banda es inferior (133 pb).
- PCR de comprobación (RB1433 ORB452-ORB454, fig. 4C2). Se amplifica la secuencia de *mCherry*, por lo que, dado que el parental WT (RB1380) no tiene la construcción, no debe observarse banda. El tamaño de banda esperado para clones con la construcción es de 1230 pb.

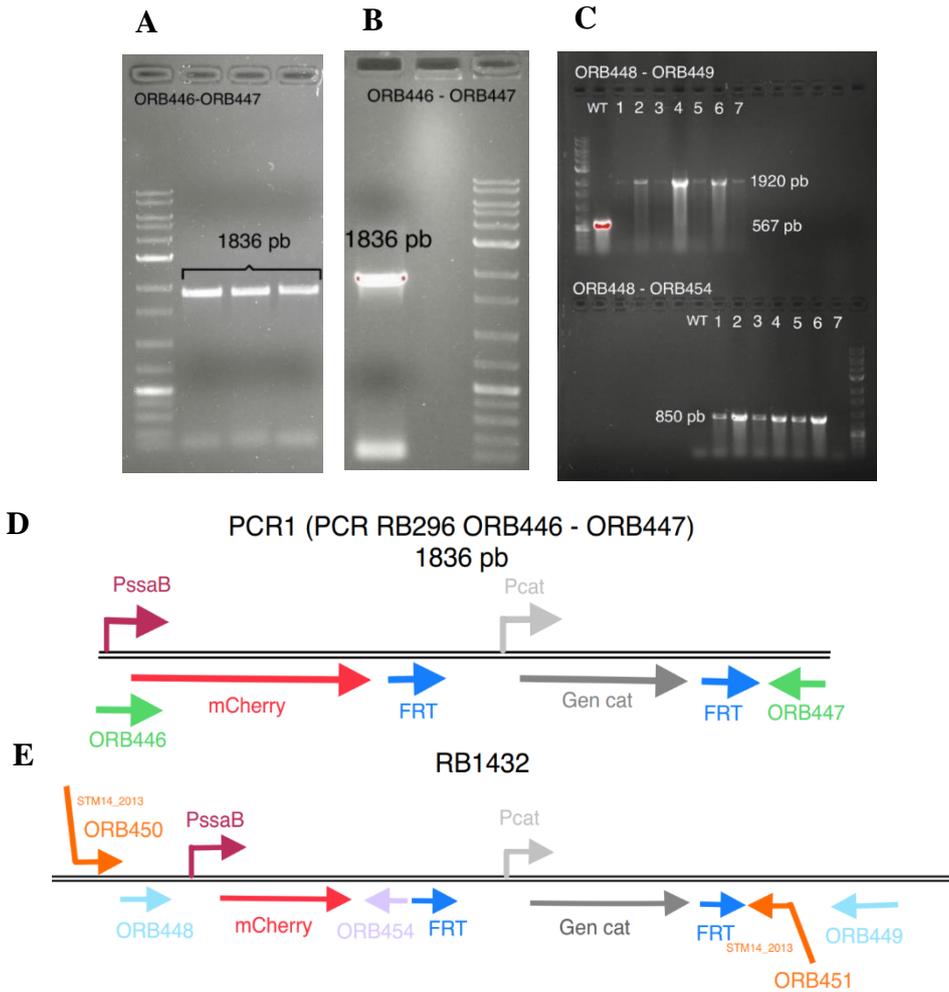


Figura 3. Productos de PCR obtenidos a partir de la estirpe RB296, PCR1: RB296 ORB446-447 (A, B, D), y RB1432 (C, E). (A) Producto de PCR antes de la purificación. Se tomaron 3 réplicas. Las muestras se realizaron mezclando 1 μ l de colorante de tampón de carga 10X con 2 μ l de producto de PCR y 7 μ l de agua. (B) Producto de PCR tras la purificación del ADN. El tamaño esperado de la banda era 1836 pb. (C) Producto de PCR de comprobación a partir de RB1432. Se tomaron muestras de 7 colonias que habían crecido tras la transformación. No fue necesario añadir tampón de carga, pues el tampón de carga de la enzima utilizada ya lo contenía. En los pocillos de arriba están las muestras amplificadas con ORB448-449. En los pocillos de abajo las muestras se amplificaron con ORB448-454. La muestra número 7 fue descartada, pues no mostró banda. (D) Representación esquemática de la secuencia obtenida en la PCR1. (E) Representación esquemática del genotipo de interés de RB1432. También se muestran los cebadores que se utilizaron en la PCR de comprobación (ORB448-ORB449, azul cielo; ORB454, lila) y los que se utilizan en la PCR2, ORB450 y ORB451 (naranja).

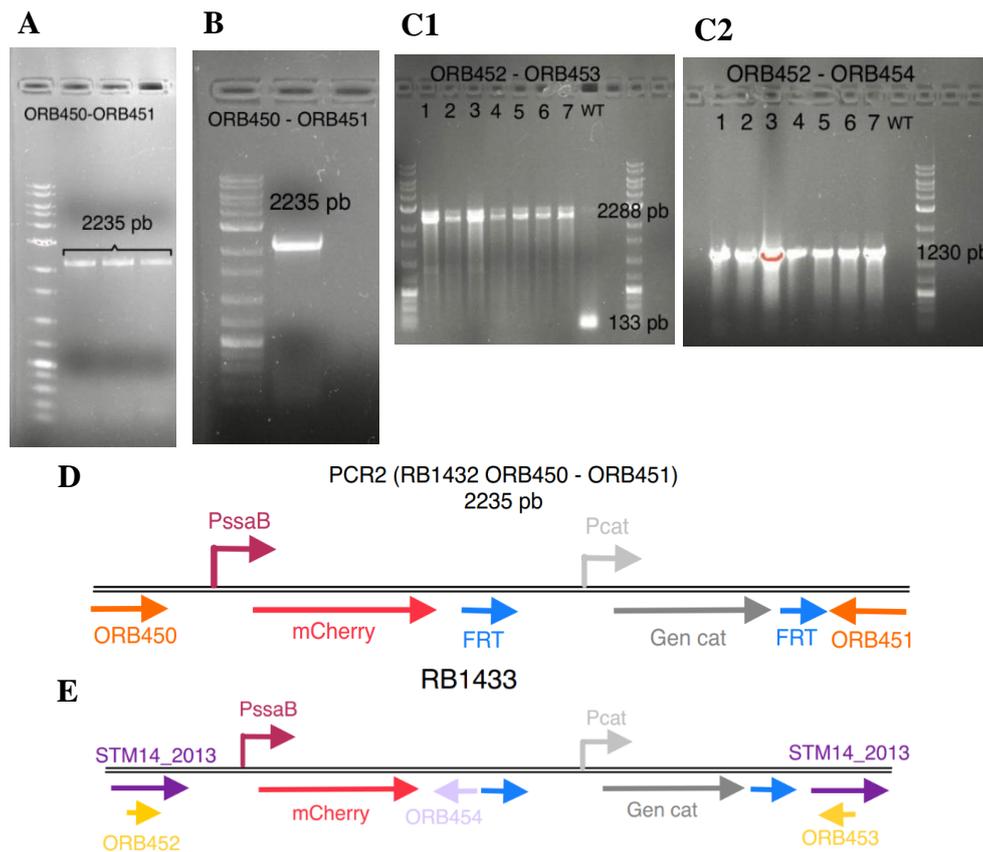


Figura 4. Productos de PCR obtenidos a partir de la estirpe RB1432 (PCR2: RB1432 ORB450-ORB451) (A, B) y RB1433 (C1, C2, D). (A) Producto de PCR antes de la purificación. Se realizaron 3 réplicas. Las muestras se realizaron mezclando 1mL de colorante de tampón de carga 10X con 2mL de producto de PCR y 7mL de agua. (B) Producto de PCR tras la purificación del ADN. El tamaño esperado de la banda era de 2235 pb. (C1, C2) Producto de la PCR de comprobación a partir de RB1433. Se tomaron muestras de 7 colonias que habían crecido tras la transformación. No fue necesario añadir tampón de carga, pues el tampón de carga de la enzima utilizada ya lo contenía. (C1) Muestras amplificadas con ORB448-ORB449. (C2) Muestras amplificadas con ORB452-ORB453. (D) Representación esquemática de la secuencia del producto de la PCR2. (E) Representación esquemática del genotipo de interés de RB1433. También se muestran los cebadores utilizados en la PCR de comprobación: ORB452, ORB453 (amarillo) y ORB454 (lila).

4.2. Expresión de las islas de patogenicidad en experimentos *ex vivo*

Para medir la expresión de fluorescencia en las bacterias, se tomaron muestras de cada estirpe y se midieron, tres réplicas de cada una, por citometría de flujo, en tres medios distintos: LB, LB 0,3 M NaCl y LPM (fig.5). El primer medio se usó como control, mientras que el segundo representa las condiciones de expresión de la SPI 1 y el tercero imita las condiciones intracelulares e induce la expresión de la SPI 2. Para cada medio de crecimiento se establecieron diferentes umbrales de expresión de fluorescencia, uno para *sfGFP* y otro para *mCherry*. La comparación de los controles positivos (RB1440 y RB1441 para la estirpe silvestre y RB1442 y RB1443 para el mutante $\Delta rnhA$) y negativos (RB1379 para la estirpe silvestre y RB1382 para el mutante $\Delta rnhA$) evidenció que el aparato y las condiciones utilizados presentan limitaciones a la hora de detectar la

expresión de fluorescencia producida desde una copia única en el cromosoma bacteriano, de manera que la distribución de fluorescencia de estirpes constitutivamente fluorescente presenta solapamiento con la distribución de fluorescencia de estirpes no fluorescentes, dificultando su distinción clara. Además, la detección de *mCherry* es poco eficiente en las condiciones experimentales y el equipamiento escogidos, y en la mayoría de los medios se observaba una alta mortalidad de bacterias, lo cual genera una dificultad adicional para diferenciar entre bacterias no fluorescentes y muertas. Por tanto, se decidió tomar como referencia únicamente los controles negativos: RB1379 para RB1436 y RB1382 para RB1437, estableciendo umbrales en valores que incluyen como población no fluorescente a la totalidad de las estirpes RB1379 y RB1382. Estos umbrales son muy restrictivos, ya que podrían dejar fuera a bacterias fluorescentes (debido al solapamiento entre las distribuciones fluorescentes y no fluorescentes); sin embargo, aseguran que todas las bacterias determinadas como fluorescentes lo son realmente, aunque, dentro de la subpoblación de bacterias determinadas como no fluorescentes pueda haber células que en realidad sean fluorescentes. Se ha preferido establecer estos umbrales restrictivos para asegurar que, aunque se pierda información debido a las limitaciones del ensayo anteriormente mencionadas, los resultados obtenidos sean mínimamente fiables.

En LB 0,3M NaCl se observa, en general, una débil expresión de fluorescencia, tanto en las estirpes testadas como en los controles constitutivos, siendo la detección de la fluorescencia verde ligeramente superior. La débil fluorescencia podría deberse a las condiciones de microaerobiosis del cultivo, lo cual provocaría una formación más lenta del fluoróforo en las proteínas fluorescentes, que necesita oxígeno para formarse. Pese a estas limitaciones, puede observarse que en el mutante $\Delta rnhA$ un porcentaje mayor de bacterias está expresando tanto la SPI 1 (*P_{sicA}-sfGFP*) como la SPI 2 (*P_{ssaB}-mCherry*), comparado con el silvestre (fig. 5A). En cuanto a la coexpresión de ambas islas en la misma bacteria (fig. 6A), se observa que, dentro de la subpoblación que expresa la SPI 1, solo un 1% de las bacterias, tanto en el silvestre como en el mutante $\Delta rnhA$, expresa también la isla 2. Esto es lo esperable en este medio, dado que favorece la expresión de la SPI 1, y no la de la SPI 2 (Temme, *et al.*, 2008). En referencia a la subpoblación que está expresando la isla 2, se observa un porcentaje más alto de bacterias expresando también la isla 1 en el mutante $\Delta rnhA$ que en el silvestre. La expresión de ambas islas dentro de una misma población podría deberse a la regulación cruzada que existe entre ambas islas (Bustamante, *et al.*, 2008; Dos Santos, *et al.*, 2020), de manera que, ciertos

genes de virulencia de la SPI 1 necesarios para la invasión de la célula eucariota hospedadora estarían bajo el control de la SPI 2, favoreciendo que una subpoblación bacteriana mantenga activas ambas islas en las condiciones testadas.

En LPM se observa un alto porcentaje de bacterias que expresan *mCherry*, tanto en los controles de expresión constitutiva, como en las estirpes RB1436 (WT) y RB1437 (mutante *ΔrnhA*). Esto es esperable, dado que las condiciones de inducción de los genes de la SPI 2 se dan a pH ácido y niveles bajos de fosfato y magnesio típicos de las condiciones intracelulares (Deiwick, *et al.*, 1999; Hautefort, *et al.*, 2003), que el medio LPM imita. Curiosamente, en el mutante *ΔrnhA*, se observa que la SPI 2 se expresa en un porcentaje de bacterias considerablemente superior a las que expresa dicha isla en el silvestre (fig. 5B). Además, también se observa un mayor porcentaje de bacterias expresando la SPI 1 en el mutante *ΔrnhA* respecto al silvestre, aunque en este caso los porcentajes son bastante bajos (fig. 5B), como es de esperar en un medio que activa la expresión de la SPI 2, no la de la SPI 1. Respecto a la coexpresión de ambas islas (fig. 6B), se observa que, de la subpoblación que expresa la SPI 1, un 55% de las bacterias en el silvestre y un 88% en el mutante *ΔrnhA*, están expresando también la isla 2. Por el contrario, en la población que expresa la SPI 2 apenas se observan bacterias que expresen también la SPI 1. Dado que la expresión de la SPI 2 se induce en este medio, los resultados son los esperados, de manera que, la población que está expresando la isla 2 no mantendría activa la isla 1. La ausencia de activación de la SPI 1 podría deberse a que en condiciones que imitan las intracelulares, esto podría suponerle un coste energético a la bacteria.

En el medio LB, que se usó como control, se observan subpoblaciones expresando cada una de las islas, sin diferencias importantes entre el silvestre y el mutante *ΔrnhA* (fig. 5C). Sin embargo, la mitad de las bacterias que expresan la SPI 2, también expresan la SPI 1 en la estirpe silvestre, mientras que en la estirpe mutante *ΔrnhA* es ligeramente inferior (44%). Por otra parte, dentro de la población que expresa la SPI 1, un bajo porcentaje de bacterias están coexpresando también la SPI 2 (6% en el silvestre y 9% en el mutante) (fig. 6C).

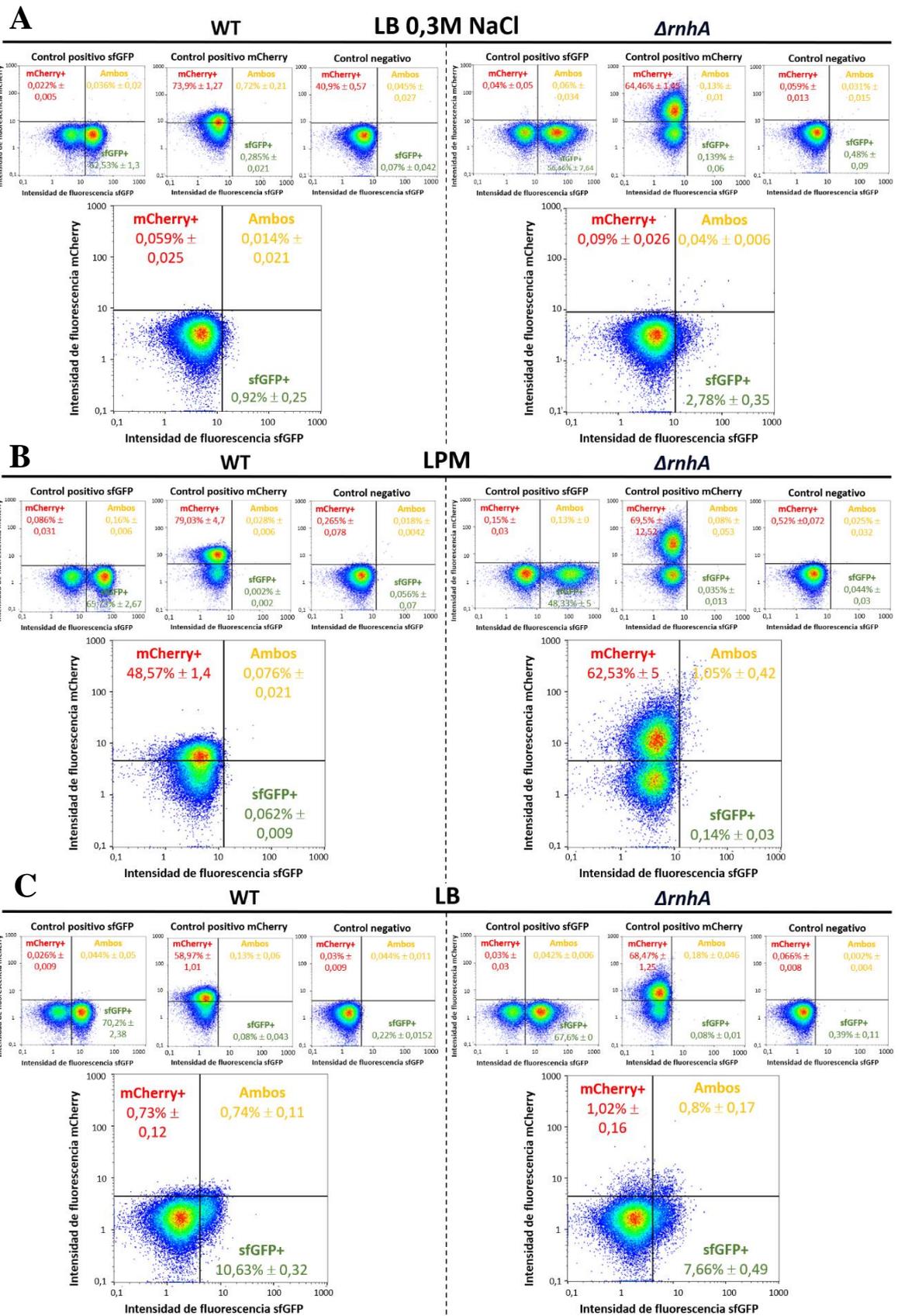


Figura 5. Análisis de citometría de flujo *ex vivo* en tres medios: LB 0,3M NaCl (A), LPM (B), LB (C). Las líneas horizontal y vertical que se cruzan marcan los umbrales que distinguen a bacterias fluorescentes rojas (cuadrante superior izquierdo), a bacterias fluorescentes verdes (cuadrante inferior derecho), a bacterias fluorescentes amarillas (cuadrante superior derecho) y a bacterias no fluorescentes (cuadrante inferior izquierdo). La línea vertical representa el umbral para la expresión de *sfGFP* (SPI 1) y la línea horizontal el umbral de expresión de *mCherry* (SPI 2). Los porcentajes de células que expresan fluorescencia verde, roja o ambas (color amarillo) que aparecen en cada gráfica indican la media y la desviación típica de 3 réplicas biológicas. La línea discontinua de cada panel (A, B y C), separa las estirpes silvestres de las mutantes $\Delta rnhA$. Las cuatro estirpes situadas a la izquierda de cada panel son silvestres y las situadas a la derecha son mutantes $\Delta rnhA$. Las estirpes de control positivo expresan constitutivamente fluorescencia verde o roja y las estirpes de control negativo no expresan fluorescencia. Las estirpes usadas como control para RB1436 (WT) son: RB1440 (control positivo *sfGFP*), RB1441 (control positivo *mCherry*) y RB1379 (control negativo). Las estirpes usadas como control para RB1437 ($\Delta rnhA$) son: RB1442 (control positivo *sfGFP*), RB1443 (control positivo *mCherry*) y RB1380 (control negativo).

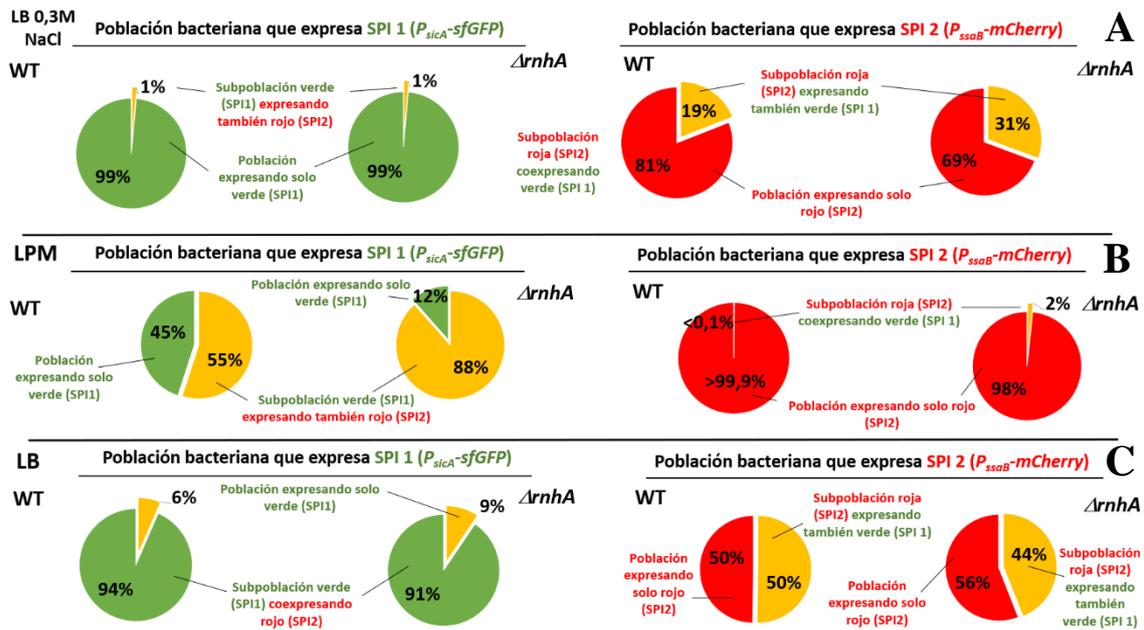


Figura 6. Representación de la coexpresión de las islas 1 y 2 a partir de los análisis de citometría de flujo *ex vivo* en 3 medios: LB 0,3M NaCl (A), LPM (B), LB (C). Las estirpes que se representan son RB1436 (WT) y RB1437 ($\Delta rnhA$). Los 6 diagramas de sectores situados a la izquierda representan el porcentaje de bacterias que expresa también fluorescencia roja (SPI 2) dentro de la subpoblación que expresa fluorescencia verde (SPI 1). Los 6 diagramas de sectores situados a la derecha representan el porcentaje de bacterias que expresa también fluorescencia verde, dentro de la subpoblación que expresa fluorescencia roja.

4.3. Expresión de las islas de patogenicidad en experimentos *in vivo*

Para obtener los patrones de expresión de SPI 1 y SPI 2 de células individuales durante infección bacteriana en células epiteliales (HeLa), se utilizaron dos réplicas por cada estirpe con ambas fusiones fluorescentes, RB1436 y RB1437 (silvestre y mutante $\Delta rnhA$, respectivamente), junto con sus controles positivos y negativos. En esta ocasión, las bacterias de expresión constitutiva actuaron al mismo tiempo como controles positivos y negativos, de manera que las estirpes RB1440 y RB1442 son controles positivos para la expresión de *sfGFP* y negativos para la expresión de *mCherry*, y las estirpes RB1441 y RB1443 son controles positivos para *mCherry* y negativos para *sfGFP*. Para cuantificar el número de células que expresaban una u otra isla, se establecieron umbrales a partir de

las estirpes control, de manera que para cada tiempo hay dos umbrales distintos, uno para la expresión de *sfGFP* y otro para la expresión de *mCherry*. De nuevo, los umbrales se colocaron de una manera restrictiva análoga a la explicada en el apartado 4.2, pues las limitaciones que se encontraron en la realización de los ensayos fueron similares, en concreto la débil expresión de fluorescencia, sobre todo a algunos tiempos analizados.

La expresión de SPI 1 y SPI 2 se midió en 4 momentos distintos durante el proceso de infección (30 minutos, 2h, 7h y 24h tras el inicio de la infección) por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia, la cual permitió monitorizar la infección, pudiendo visualizar las diferencias entre el silvestre y el mutante $\Delta rnhA$ y las variaciones en la expresión de fluorescencia en los controles de expresión constitutiva a lo largo de los cuatro tiempos (figuras. 5 y 7).

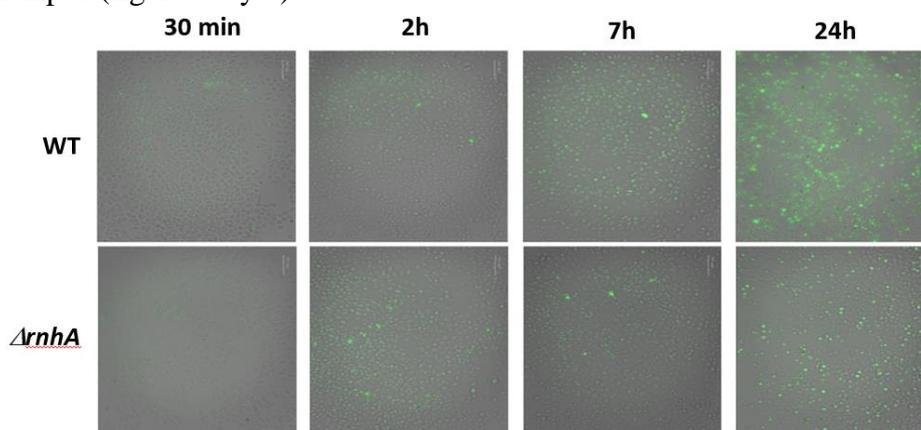


Figura 7. Imágenes de la infección de células HeLa con bacterias WT (RB1440) y mutantes $\Delta rnhA$ (RB1442) que expresan constitutivamente el gen *sfGFP* en 4 tiempos distintos.

Tabla 5. Medianas de la intensidad de fluorescencia de los controles positivos de expresión constitutiva.

	30 min	2h	7h	24h
WT	25,05 ± 0,5	23,9 ± 0	36,75 ± 0,64	33,6 ± 2,12
WT	10,05 ± 0,21	10,1 ± 0,14	12,65 ± 0,85	15,95 ± 0,28
$\Delta rnhA$	66,05 ± 0,35	39,75 ± 0,92	58,55 ± 2,8	65,85 ± 1,06
$\Delta rnhA$	18 ± 0	21,25 ± 3,2	18,5 ± 6,51	28,05 ± 0,64

Se muestran las medias de las medianas de dos réplicas biológicas junto con su desviación típica. Las estirpes de expresión constitutiva de la SPI 1 (recuadros verdes) son RB1440 (WT) Y RB1442 ($\Delta rnhA$) y las estirpes de expresión constitutiva de la SPI 2 (recuadros rojos) son RB1441 (WT) y RB1443 ($\Delta rnhA$).

A los 30 minutos ambos controles positivos muestran niveles de expresión moderados (tabla 5) y el porcentaje de bacterias que expresan las islas es bajo tanto en la estirpe silvestre (RB1436) como en el mutante $\Delta rnhA$ (RB1437), siendo un poco más alta la expresión de la SPI 1 (fig. 8A). En cuanto a la coexpresión de las islas, no se observan grandes diferencias entre el silvestre y el mutante $\Delta rnhA$, pues, tanto en la subpoblación

que expresa la SPI 1, como en la subpoblación que expresa la SPI 2, el porcentaje de bacterias expresando también la otra isla es bajo, especialmente en la subpoblación que expresa la SPI 1 (fig. 9A).

A las 2h la fluorescencia de los controles constitutivos sigue siendo baja (tabla 5), lo que causa que la expresión observable de las islas sea menor que a los 30 minutos (fig. 8B). Además, los resultados para la expresión de la SPI 2 dentro de la subpoblación que expresa la SPI 1 son similares a los descritos a los 30 minutos. En el caso de la población que expresa la SPI 2, en este punto se observa un mayor porcentaje de bacterias expresando también la isla 1, comparado con el que se observó a los 30 minutos, siendo este porcentaje mayor en el silvestre que en el mutante *ΔrnhA* (fig. 9B).

A las 7h la fluorescencia de los controles positivos mejora ligeramente (tabla 5), y se observa que la proporción de bacterias que expresa la isla 1 continúa disminuyendo tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *ΔrnhA*, mientras que se observa un ligero aumento en el porcentaje de bacterias que expresa la isla 2, siendo el porcentaje un poco más alto en el mutante (fig. 8C). En cuanto a la coexpresión de ambas islas (fig. 9C), en la subpoblación que expresa la SPI 1 sigue habiendo un porcentaje bajo de bacterias que además expresa la SPI 2, sin observarse grandes diferencias entre el silvestre y el mutante. Sin embargo, dentro de la subpoblación que expresa la SPI 2, el patrón cambia entre el silvestre y el mutante *ΔrnhA*: en el silvestre aumenta el porcentaje de células expresando también la SPI 1 (del 71% a las 2h al 75% a las 7h), mientras que, en el mutante este porcentaje disminuye (del 57% a las 2h al 50% a las 7h).

A las 24h la expresión de los controles positivos es intensa (tabla 5), y se observa un importante aumento en el porcentaje de células que expresan la isla 2, siendo éste mayor en el caso de la estirpe mutante *ΔrnhA* en comparación con la silvestre (37,3% frente a 12,6%). Por el contrario, las bacterias expresando la isla 1 siguen representando un pequeño porcentaje de la población bacteriana (fig. 8D). En referencia a la coexpresión de las islas, el patrón es diferente con respecto al resto de tiempos medidos, pues ahora, se observa que, casi la totalidad de las bacterias que expresa la isla 2 solo están expresando dicha isla, siendo los porcentajes similares en ambas estirpes. Por el contrario, dentro de la subpoblación que está expresando la isla 1, hay un aumento de bacterias que también expresan la SPI 2, siendo este porcentaje mucho mayor en el mutante *ΔrnhA* (72%) que en el silvestre (15%) (fig. 9D). La presencia de células expresando solamente la SPI 1,

podría deberse a que, dado que a las 24h se está produciendo lisis de células eucariotas, existan subpoblaciones de bacterias que se dispongan a reinfectar otras células tras haber lisado las primeras, para lo cual se requiere la activación de la SPI 1.

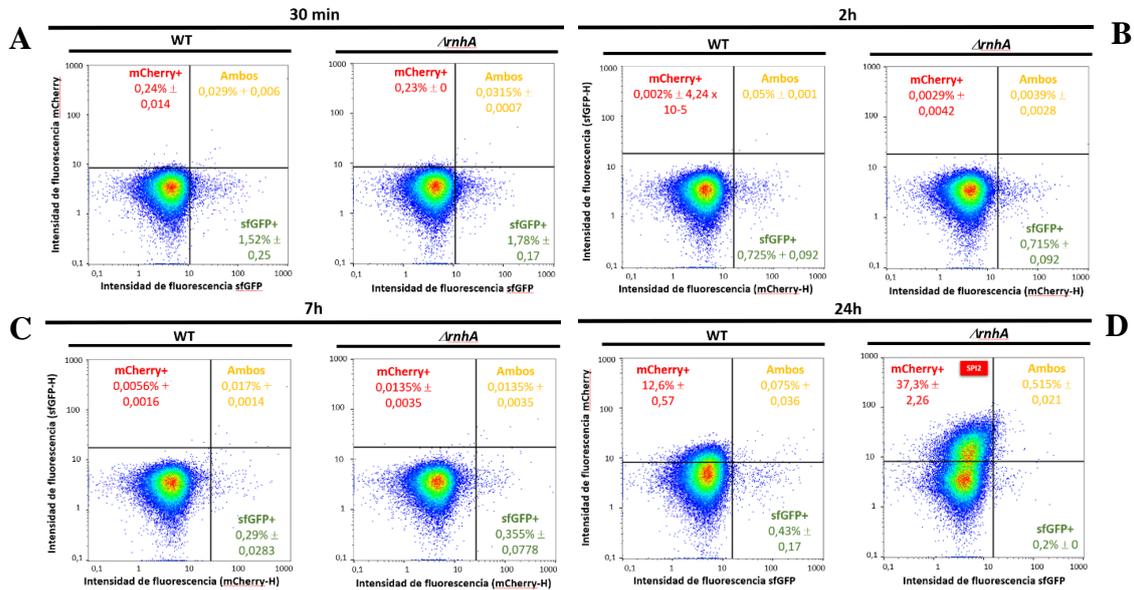


Figura 8. Análisis de citometría de flujo *in vivo* en 4 cuatro tiempos tras la infección de células epiteliales HeLa con bacterias. (A) 30 minutos, (B) 2h, (C) 7h, (D) 24h. Las líneas horizontal y vertical que se cruzan marcan los umbrales que distinguen a bacterias fluorescentes rojas (cuadrante superior izquierdo), a bacterias fluorescentes verdes (cuadrante inferior derecho), a bacterias fluorescentes amarillas (cuadrante superior derecho) y a bacterias no fluorescentes (cuadrante inferior izquierdo). La línea vertical representa el umbral para la expresión de *sfGFP* (SPI 1) y la línea horizontal el umbral de expresión de *mCherry* (SPI 2). Los porcentajes de células que expresan fluorescencia verde, roja o ambas (color amarillo) que aparecen en cada gráfica indican la media y la desviación típica de 2 réplicas biológicas.

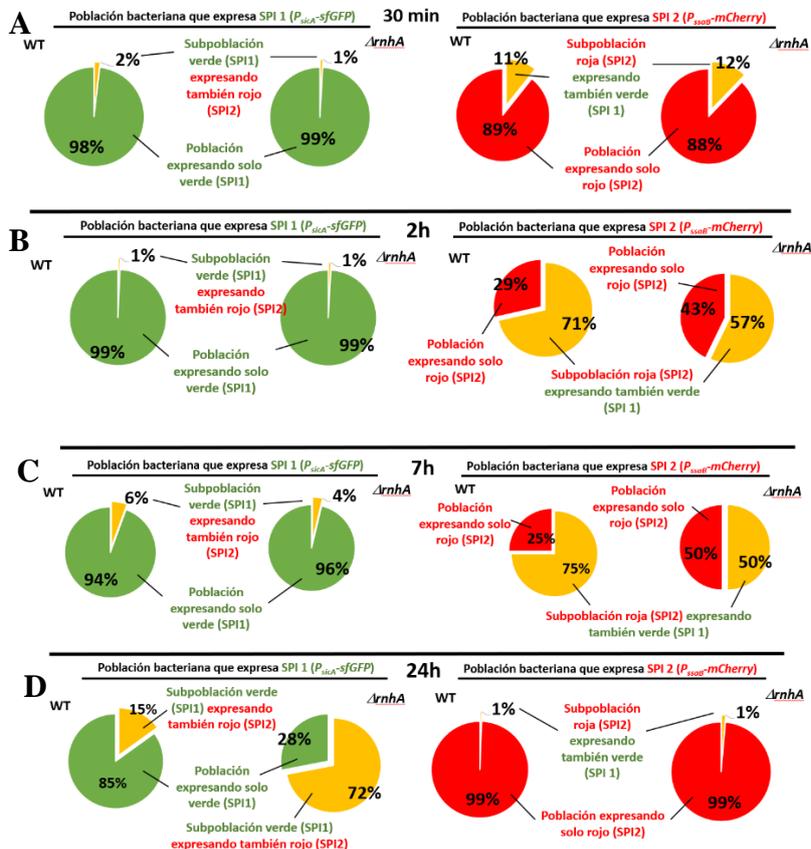


Figura 9. Representación de la coexpresión de las islas 1 y 2 a partir de los análisis de citometría de flujo *in vivo* en 4 tiempos: (A) 30 minutos, (B) 2h, (C) 7h, (D) 24h. Las estirpes que se representan son RB1436 (WT) y RB1437 ($\Delta rnhA$). Los 6 diagramas de sectores situados a la izquierda representan el porcentaje de bacterias que expresa también fluorescencia roja dentro de la subpoblación que expresa fluorescencia verde. Los 6 diagramas de sectores situados a la derecha representan el porcentaje de bacterias que expresa también fluorescencia verde, dentro de la subpoblación que expresa fluorescencia roja.

5. CONCLUSIONES

1. Hay una subpoblación de bacterias que expresa simultáneamente ambas islas de patogenicidad. Tanto en los ensayos *ex vivo* como en los *in vivo*, pueden visualizarse en todos los medios y todos los tiempos de infección medidos, respectivamente, subpoblaciones que están expresando la SPI 1 y la SPI 2.
2. La RNasa afecta al porcentaje de células que expresan y coexpresan las islas. Las diferencias, en los porcentajes de células coexpresando ambas islas, entre las estirpes silvestres y mutantes ($\Delta rnhA$), pone de manifiesto que la RNasa HI influye en la expresión de las islas.
3. La RNasa HI afecta a los porcentajes de expresión de las islas *in vivo*. Aunque al inicio del ensayo *in vivo*, a los 30 minutos, los porcentajes de coexpresión son muy similares, la estirpe silvestre y mutante difieren en los patrones de expresión de las islas conforme transcurre el tiempo. Las diferencias en la coexpresión empiezan a hacerse evidentes a partir de las 2h dentro de la población que expresa la SPI 2. Sin embargo, no es hasta las 24h cuando se observa que dentro de la población que expresa la SPI I hay una un porcentaje de bacterias que expresa también la SPI 2, y que difiere bastante entre el silvestre y el mutante $\Delta rnhA$.

5.1. Posible significado biológico de los resultados obtenidos

Estas observaciones podrían tener un significado biológico en el que el hecho de que una subpoblación de bacterias expresando ambas islas suponga una ventaja adaptativa para el total de la población bacteriana (fig. 10). Durante la invasión de la célula hospedadora (Fase I) se requiere que al menos un subgrupo de bacterias exprese la SPI 1, lo cual permite que dicha subpoblación induzca cambios en la fisiología de la célula hospedadora que permiten que la población completa (esté expresando la SPI 1 o no) sea internalizada por la célula eucariota. Si, en el momento de penetrar en el ambiente intracelular (Fase II), la totalidad de la población bien expresase exclusivamente la SPI 1, o bien no expresase ninguna de las islas, la población bacteriana requerirá de un tiempo para expresar la SPI 2, ensamblar el inyectisoma y comenzar a translocar proteínas de virulencia al citoplasma de la célula hospedadora. Sin embargo, si en esa población bacteriana existiera una subpoblación expresando la SPI 2, dicha subpoblación podría

iniciar inmediatamente el proceso de alteración de la fisiología de la célula hospedadora para favorecer la proliferación de la población de *Salmonella* al completo. Esto conferiría una ventaja adaptativa a esa población bacteriana frente a la anteriormente mencionada. Si, además, esa subpoblación que expresa la SPI 2 estuviera además expresando la SPI 1, podrían iniciar la fase de reinfección de una nueva célula hospedadora una vez lisada la anterior, lo cual, de nuevo, conferiría una ventaja adaptativa al total de la población bacteriana.

Esta interpretación especulativa es coherente con los resultados obtenidos durante este Trabajo de Fin de Grado, pero haría falta investigación adicional para identificar el significado biológico y evolutivo de los fenómenos observados.

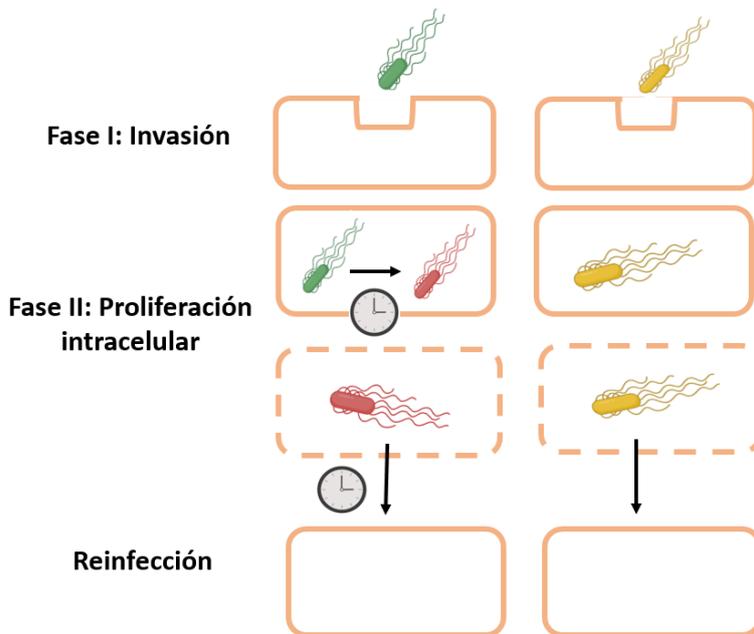


Figura 10. Esquema representativo del posible significado biológico de los resultados obtenidos. La bacteria verde representa una población de bacterias que expresa la SPI 1. La bacteria amarilla representa una población de bacterias que expresa ambas islas. La bacteria roja representa una población de bacterias que expresa la SPI 2. Las líneas discontinuas en las células de la fase II representan la lisis de la célula eucariota hospedadora.

Bibliografía

- Anon., 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp. 5978-5983.
- Bossi, L. y otros, 2019. NusG prevents transcriptional invasion of H-NS-silenced genes. *PLoS Genetics*, 15(10), pp. 1-22.
- Bustamante, V. H. y otros, 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *PNAS*, 105(38), p. 14591–14596.
- Costa, T. R. D. y otros, 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, Volumen 13, pp. 343-359.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*, 97(12).
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. & Hensel, M., 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular microbiology*, 31(6), pp. 1759-1773.
- Dos Santos, A. M. M. P., Ferrari, R. G. & Conte-Junior, C. A., 2020. Type three secretion system in *Salmonella* Typhimurium: the key to infection. *Genes & Genomics*, Volumen 42, pp. 495-506.
- Ferrari, R. G. y otros, 2019. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Base Foods: a Meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), pp. 1-21.
- Figueroa-Bossi, N., Balbontín, R. & Bossi, L., 2022. Basic Bacteriological Routines. 2022(10).
- Figueroa-Bossi, N. y otros, 2022. Pervasive transcription enhances the accessibility of H-NS-silenced promoters and generates bistability in *Salmonella* virulence gene expression. *PNAS*, 119(30).
- Hautefort, I., Proença, M. J. & Hinton, J. C. D., 2003. Single-Copy Green Fluorescent Protein Gene Fusions Allow Accurate Measurement of *Salmonella* Gene Expression In Vitro and during Infection of Mammalian Cells. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 69(12), p. 7480–7491.
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, Volumen 294, pp. 95-102.
- J. Bäumlér, A., M. Tsolis, R., A. Ficht, T. & Garry Adams, L., 1998. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 66(10), pp. 4579-4587.
- Jennings, E., Thurston, T. L. M. & Holden, D. W., 2017. *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion. *Cell Host & Microbe*, 22(2), pp. 217-231.
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J., 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, Volumen 290, pp. 325-331.
- Marinelli, L. J., Hatfull, G. F. & Piuri, M., 2012. Recombineering. *Bacteriophage*, Volumen 2, pp. 5-14.

- Murphy, K. C., Campellone, K. G. & Poteete, A. R., 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *GENE*, 246(1-2).
- Pérez-Morales, D. y otros, 2017. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. 7(13), pp. 1-27.
- Ramos-Morales, F., 2012. Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *International Scholarly Research Network Cell Biology*, Volumen 2012, pp. 1-36.
- Saini, S., Ellermeier, J. R., Slauch, J. M. & Rao, C. V., 2010. The Role of Coupled Positive Feedback in the Expression of the SPI 1 Type Three Secretion System in *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, 6(7), pp. 1-16.
- Sánchez Romero, M. A. & Casadesús, J., 2018. Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. *Scientific reports* , 8(14875), pp. 1-11.
- Sánchez-Romero, M. A. & Casadesús, J., 2021. Single Cell Analysis of Bistable Expression of Pathogenicity Island 1 and the Flagellar Regulon in *Salmonella enterica*. *Microorganisms*, 9(210), pp. 1-9.
- Schmieger, H., 1972. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular and General Genetics MGG*, Volumen 119, pp. 75-88.
- Temme, K. y otros, 2008. Induction and Relaxation Dynamics of the Regulatory Network Controlling the Type III Secretion System Encoded within *Salmonella* Pathogenicity Island 1. *Journal of Molecular Biology*, 377(1), pp. 47-61.
- Thiennimitr, P. y otros, 2011. Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolaminutose to compete with the microbiota. *PNAS*, 108(42), p. 17480–17485.