



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Factores de virulencia de *Serratia marcescens*”

Lic. Martina Lazzaro

Directora: Dra. Eleonora García Véscovi

**Rosario, Argentina
2019**

“Factores de virulencia de *Serratia marcescens*”

Martina Lazzaro

Licenciada en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los años 2014 y 2019 bajo la dirección de la Dra. Eleonora García Véscovi.

Dra. Eleonora García Véscovi:

Jurado 1:

Jurado 2:.....

Jurado 3:

Defendida:

AGRADECIMIENTOS

Llegamos al final del camino. Y si llegué hasta acá fue gracias a las personas que me acompañaron a lo largo de estos 5 años. A cada uno de ustedes les quiero agradecer.

A la Dra. Eleonora García Véscovi, gracias por haber sido mi guía durante estos años. Por confiar en mí, por dejarme crecer científicamente y por generar un ambiente donde me sentí muy segura.

A los Dres. Fernando Soncini y Susana Checa. Gracias por la buena predisposición para discutir resultados, por los consejos, los comentarios y las sugerencias.

A los Dres. Javier Mariscotti y Gisela Di Venanzio. Gracias por toda la ayuda, la infinita paciencia y los empujones hacia la dirección correcta.

A los Dres. Darío Krapf, Mario Feldman y Dominique Ferrandon. Gracias por aceptarme como parte de sus laboratorios, por guiarme y ayudarme cada vez que lo necesité.

A todas las personas que formaron parte del Lab7. Gracias por las salidas, las charlas, las risas y por hacer que este camino sea un poco más fácil.

A los chicos de otros laboratorios, por las juntadas, los consejos y los buenos momentos.

Al personal de apoyo fantástico que trabaja en el instituto. Esta tesis no hubiera sido posible sin ustedes.

Particularmente quiero agradecer a todas las personas que me crucé en este camino y se convirtieron en mis amigos. A esas personas que me hacen reír, me acompañan siempre y me mantienen con los pies en la tierra. Estoy feliz de haber encontrado amigos tan incondicionales. Con decirles “gracias” me quedo muy corta.

A mis amigos de toda la vida, a mis amigos nuevos, a los que no veo tan seguido. Gracias por el cariño, por los buenos momentos y la compañía en los momentos no tan buenos.

A mi familia. Se merecen un “Gracias” enorme. Especialmente mi mamá, mi papá y mi hermano. Estoy hoy acá gracias a su amor, su esfuerzo y su apoyo incondicional. Gracias por acompañarme en cada pasito que doy y por hacer hasta lo imposible para que sea feliz.

A Martín, mi compañero en este camino y en la vida. Gracias por el apoyo, la paciencia, la contención y por siempre confiar en que todo va a salir bien.

GRACIAS!

Parte de los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas.

Trabajos publicados:

- 1. Martina Lazzaro**, Darío Krapf and Eleonora García Véscovi. "Selective blockage of *Serratia marcescens* ShIA by nickel inhibits the pore forming toxin-mediated phenotypes in eukaryotic cells". En revisión.
- 2.** Roberto E. Bruna, María Victoria Molino, **Martina Lazzaro**, Javier F. Mariscotti and Eleonora García Véscovi. "CpxR-dependent thermoregulation of *Serratia marcescens* PrtA metalloprotease expression and its contribution to bacterial biofilm formation". *Journal of Bacteriology*. 2018 Jan 29. doi: 10.1128/JB.00006-18.
- 3. Martina Lazzaro**, Mario F. Feldman and Eleonora García Véscovi. "A transcriptional regulatory mechanism finely tunes the firing of Type VI Secretion System in response to bacterial enemies". *mBio*. 2017 Aug 22;8(4). doi: 10.1128/mBio.00559-17.
- 4.** Di Venanzio, Gisela*; **Lazzaro, Martina***; Morales, Enrique S; Krapf, Darío; García Véscovi, Eleonora. "A pore-forming toxin enables *Serratia* a non-lytic egress from host cells". (***Los autores contribuyeron de manera igualitaria**). *Cellular Microbiology*. 2017 Feb;19(2). doi: 10.1111/cmi.12656.

Presentaciones a reuniones científicas:

- 1. Martina Lazzaro**, Roberto E Bruna, María Victoria Molino, Javier F Mariscotti, Eleonora García Véscovi. "Survival strategies learned from an opportunistic pathogen". 2018. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). Santiago, Chile.
- 2. Martina Lazzaro** and Eleonora García Véscovi. "*Serratia marcescens* ShIA hemolysin is inhibited by Ni²⁺". 2018. LIV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Paraná, Argentina.
- 3. Martina Lazzaro**, Mario F Feldman and Eleonora García Véscovi. "*Serratia marcescens* Type VI Secretion System is transcriptionally upregulated by RcsB in response to the attack of bacterial competitors". 2017. LIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- 4.** Roberto Emanuel Bruna, María Victoria Molino, **Martina Lazzaro**, Eleonora García Véscovi. "PrtA metalloprotease expression is regulated by CpxR and contributes to *Serratia marcescens* biofilm formation". 2017. LIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- 5. Lazzaro, M;** García Véscovi, E. "El Sistema de Secreción Tipo VI de *Serratia marcescens* está regulado a nivel transcripcional por el Sistema Rcs". 2016. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología (ALAM-CAM). Rosario, Argentina.

6. Di Venanzio, Gisela*; **Lazzaro, Martina***; Morales, Enrique S.; Krapf, Darío and García Véscovi, Eleonora. "A pore-forming toxin enables *Serratia* a harmless way out from host cells". 2016. (***Los autores contribuyeron de manera igualitaria**). 23rd Annual Midwest Microbial Pathogenesis Conference. University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, United States.
7. **Lazzaro, Martina**; García Véscovi, Eleonora. "Regulation of the Type VI Secretion System of *Serratia marcescens*: the role of the Rcs System". 2015. LI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Argentina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	5
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
I.1. <i>Serratia marcescens</i>	11
I.1.1. Género <i>Serratia</i>	11
I.1.2. Antecedentes históricos de <i>S. marcescens</i>	11
I.1.3. Patogénesis de <i>Serratia</i>	12
I.1.4. Factores de virulencia	14
I.1.4.1. Prodigiosina.....	14
I.1.4.2. Resistencia a antibióticos	14
I.1.4.3. Detección de densidad celular (<i>quorum sensing</i>).....	15
I.1.4.4. Flagelo.....	16
I.1.4.5. Motilidad de tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i> y producción de biosurfactantes	17
I.1.4.6. Formación de biopelículas	18
I.1.4.7. Exoproteínas	19
I.2. Sistemas de Secreción de Tipo VI	19
I.2.1. Estructura y mecanismo de acción.....	20
I.2.2. Efectores y función del SST6	21
I.2.3. Regulación del SST6.....	23
I.2.4. SST6 de <i>S. marcescens</i>	23
I.3. Sistemas de dos componentes	25
I.3.1. Sistema RcsCDB	26
I.4. Hemolisina.....	28
I.4.1. Sistemas de secreción de dos compañeros	28
I.4.2. Generalidades ShIA	29
I.4.3. Generalidades ShIB	29
I.4.4. Regulación de la actividad hemolítica	30
I.4.5. Rol de ShIA en la patogénesis de <i>S. marcescens</i>	31
I.4.6. Otras toxinas formadoras de poros	32
I.5. Biología celular de patógenos intracelulares.....	33
I.5.1. Internalización	33
I.5.2. Sistema inmune del hospedador	34
I.5.3. Mecanismos de egreso de patógenos.....	35
II. OBJETIVOS	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39
III.1. Cepas bacterianas, líneas celulares, plásmidos y oligonucleótidos.....	39
III.2. Medios de cultivo	42

III.3. Técnicas moleculares de ácidos nucleicos.....	43
III.3.1. Preparación de ADN cromosomal.....	43
III.3.2. Preparación de ADN bacteriano plasmídico.....	43
III.3.3. Extracción de ARN total a partir de cultivos bacterianos de <i>S. marcescens</i>	44
III.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
III.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR).....	45
III.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR).....	45
III.3.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	45
III.3.8. Purificación de fragmentos de ADN.....	46
III.3.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	46
III.3.10. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN.....	46
III.3.11. Construcción del plásmidos reporteros y de expresión.....	46
III.3.12. Servicios de secuenciación de ADN.....	47
III.4. Preparación de células competentes.....	47
III.5. Transformación de células competentes y selección de transformantes.....	47
III.6. Conjugación bipartita.....	47
III.7. Conjugación tripartita.....	47
III.8. Manipulación genética.....	48
III.8.1. Construcción de la cepa mutante <i>tssM</i> en <i>S. marcescens</i> Db10 por inserción del vector suicida pKNG101.....	48
III.9. Técnicas bioquímicas y moleculares de proteínas.....	48
III.9.1. Preparación de extractos extracelulares de <i>S. marcescens</i>	48
III.9.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	48
III.9.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	49
III.9.4. Tinción y visualización de geles con azul de Coomassie.....	49
III.9.5. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (Western blot).....	49
III.10. Expresión y purificación de las proteínas RcsB y Hcp de fusión a cola de histidina.....	50
III.11. Preparación de Anticuerpos anti-Hcp.....	51
III.12. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína.....	51
III.12.1. Fosforilación de oligonucleótidos.....	51
III.12.2. Ensayos de retardo electroforético del ADN.....	51
III.12.3. Ensayo de protección de la ADNasa I (<i>DNA footprinting</i>).....	52
III.12.4. Secuenciación de ADN.....	52
III.13. Análisis bioinformáticos.....	53
III.13.1. Obtención de porcentajes de identidad de nucleótidos de los genes que codifican para el SST6.....	53
III.13.2. Predicción del sitio de unión para RcsB en la región promotora de SST6.....	53
III.13.3. Análisis de la región promotora del SST6.....	53

III.14. Curvas de crecimiento bacteriano	54
III.15. Medidas de actividad transcripcional en medio líquido	54
III.16. Ensayos de competencia interbacteriana.....	54
III.16.1. Ensayos de competencia interbacteriana estándar	54
III.16.2. Ensayos de competencia interbacteriana con medida de reportero transcripcional	54
III.16.3. Ensayos de competencia interbacteriana tripartita	55
III.16.4. Ensayos de competencia interbacteriana tripartita con medida de reportero transcripcional.....	55
III.17. Ensayos de actividad transcripcional utilizando el reportero ppromSST6.....	55
III.17.1. Medidas de actividad transcripcional en medio líquido	55
III.17.2. Medidas de actividad transcripcional en medio sólido.....	55
III.17.3. Medidas de actividad transcripcional luego de incubación con lisado bacteriano....	55
III.17.4. Medidas de actividad transcripcional luego de incubación con sobrenadante de competencia	56
III.17.5. Medidas de actividad transcripcional en ensayo de difusión	56
III.17.6. Medidas de actividad transcripcional en ensayo de estrés a envoltura bacteriana..	56
III.18. Ensayos de permeabilización de membrana	57
III.18.1. Ensayos de permeabilización de membrana externa	57
III.18.2. Ensayos de permeabilización de membrana interna	57
III.19. Ensayos de hemólisis en medio líquido	57
III.20. Técnicas de cultivos celulares.....	57
III.20.1. Ensayos de protección a gentamicina o kanamicina	57
III.20.2. Ensayo de egreso.....	58
III.20.3. Ensayo de protección a gentamicina con indicador de Ca ²⁺	58
III.20.4. Ensayo de protección a gentamicina con quelantes de Ca ²⁺	59
III.20.5. Ensayo de protección a gentamicina con ionóforo de Ca ²⁺	59
III.20.6. Ensayos de protección a gentamicina en presencia de Bafilomicina A1 o NH ₄ Cl....	60
III.20.7. Ensayos de protección a gentamicina en inhibidores de canales de Ca ²⁺	60
III.20.8. Ensayos de autofagia	60
III.20.9. Transfección de células epiteliales	61
III.20.10. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	61
III.20.11. Video microscopía	61
III.20.12. Ensayos de viabilidad celular.....	61
III.20.12.1. Ensayo de reducción de MTT.....	61
III.20.12.2. Ensayo de Vivas/Muertas.....	62
III.20.12.3. Tinción con yoduro de propidio	62
III.20.13. Ensayo de susceptibilidad a gentamicina en bacterias extracelulares	63
III.20.14. Ensayos de actividad N-Acetil-β-d-gluocosaminidasa (β-hexosaminidasa).....	63
III.20.15. Inmunodetección de α-tubulina	63
III.21. Análisis estadístico	63

IV. Capítulo I. Regulación del sistema de secreción de tipo VI de <i>S. marcescens</i> y rol en competencia interbacteriana.	64
IV.1. INTRODUCCIÓN	64
IV.2. RESULTADOS	65
IV.2.1. Identificación <i>in silico</i> de genes que codifican para el SST6 en el aislamiento clínico <i>S. marcescens</i> RM66262	65
IV.2.2. Análisis funcional del SST6	67
IV.2.3. Análisis de la termorregulación del SST6	69
IV.2.4. Búsqueda de factores regulatorios del SST6	70
IV.2.5. Regulación del SST6 por parte del sistema Rcs	73
IV.2.6. Determinación de la interacción de RcsB con la región promotora del SST6	76
IV.2.7. Evaluación de la habilidad antibacteriana interespecífica de <i>S. marcescens</i> RM66262	78
IV.2.8. Análisis de la capacidad antibacteriana intraespecífica de <i>S. marcescens</i>	79
IV.2.9. Modulación transcripcional del SST6 en presencia de bacterias competidoras	82
IV.2.10. Evaluación de la direccionalidad del contraataque inducido por la presencia de bacterias competidoras	86
IV.2.11. Búsqueda de la señal inductora de la transcripción del <i>cluster</i> génico del SST6	89
IV.2.12. Relevancia del SST6 en la invasión y la replicación intracelular en células CHO	97
IV.3. DISCUSIÓN	99
IV.4. CONCLUSIONES	103
V. Capítulo II. Mecanismo de egreso de <i>S. marcescens</i> luego de la invasión en células no fagocíticas	104
V.1. INTRODUCCIÓN	104
V.2. RESULTADOS	105
V.2.1. Rol de la hemolisina ShIA en el mecanismo de egreso	105
V.2.2. Caracterización del mecanismo de egreso	106
V.2.3. Rol del calcio en el mecanismo de egreso	110
V.2.4. Rol de la acidificación vacuolar en el egreso de <i>Serratia</i>	119
V.3. DISCUSIÓN	122
V.4. CONCLUSIONES	125
VI. Capítulo III. Inhibición de la toxina formadora de poros ShIA	126
VI.1. INTRODUCCIÓN	126
VI.2. RESULTADOS	127
VI.2.1. Rol de los canales de Ca ²⁺ eucariotas en el mecanismo de egreso de <i>Serratia</i>	127
VI.2.2. Efecto del Ni ²⁺ sobre la expresión y secreción de hemolisina ShIA	131
VI.2.3. Efecto del Ni ²⁺ sobre los fenotipos dependientes de ShIA	133
VI.2.4. Reversibilidad de la inhibición de ShIA causada por Ni ²⁺	138
VI.3. DISCUSIÓN	141
VI.4. CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	144

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	aminoácido
Abs260	absorbancia a 260 nanómetros
Abs280	absorbancia a 280 nanómetros
Abs 420 nm	absorbancia a 420 nanómetros
Abs 490 nm	absorbancia a 490 nanómetros
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
aHSL	N-acil-homoserin lactona
AI-2	autoinductor 2
AM	acetoximetilo
α -MEM	medio de cultivo esencial mínimo alfa
Amp ^R	resistente a ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato
Ci	Curie
Cm ^R	resistente a cloranfenicol
Cy3	molécula fluorescente 3 derivada de la cianina
Da	Daltons
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	dimetilsufóxido
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
DO _{600nm}	densidad óptica a 600 nanómetros
ECA	antígeno común de las enterobacterias
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
GFP	proteína verde fluorescente
Gm ^R	resistente a gentamicina
h	hora(s)
His	histidina
HQ	histidina quinasa
IP	ioduro de propidio

IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Km ^R	resistente a kanamicina
LB	Luria Bertani
LDH	lactato deshidrogenasa
LLO	listeriolisina O
LPS	lipopolisacárido
mA	miliamperios
ME	membrana externa
MI	membrana interna
min	minuto(s)
MOI	multiplicidad de infección
MPM	marcador de peso molecular
NBT	azul de nitrotetrazolio
nt	nucleótido
OMVs	vesículas de membrana externa
ONPG	orto-nitrofenil- β -galactósido
p.i.	post-infección
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFT	toxina formadora de poros
qPCR	PCR cuantitativa
RT-PCR	retro-transcriptasa PCR
RR	regulador respuesta
s	segundo(s)
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SeCV	vacuola que contiene a <i>Serratia</i>
<i>Sma</i>	<i>Serratia marcescens</i>
SN	sobrenadante
Sp ^R	resistente a espectinomicina
SST6	sistema de secreción tipo VI
TCA	ácido tricloroacético
Tc ^R	resistente a tetraciclina
TBE	<i>buffer</i> Tris-borato-EDTA
TBS	<i>buffer</i> Tris salino
TCS	sistema de dos componentes

TE	<i>buffer</i> Tris-EDTA
TPS	sistema de dos compañeros
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	unidad enzimática
UF	unidad de fluorescencia
UFC	unidad formadora de colonias
vH ⁺ -ATPasa	adenosina 5'trifosfato hidrolasa V
v/v	volumen/volumen

IDIOMA EXTRANJERO

<i>buffer</i>	solución reguladora
<i>cluster</i>	grupo

RESUMEN

Serratia marcescens es una enterobacteria caracterizada por su ubicuidad, ya que puede ser aislada de aire, suelo y agua, así como también de un amplio rango de organismos hospedadores, incluyendo invertebrados, vertebrados y plantas. En humanos, es un patógeno oportunista, aislándose como agente etiológico de un vasto espectro de infecciones, con creciente incidencia en ámbitos extra e intra-hospitalarios. En conjunto, estas particularidades señalan a *Serratia* como un organismo particularmente versátil, capaz de desplegar eficientes estrategias adaptativas que le permiten subsistir y proliferar tanto en medios abióticos como bióticos, superando el desafío que representan las condiciones medioambientales cambiantes y adversas.

Este trabajo de Tesis propone la utilización de *S. marcescens* como modelo de estudio para ahondar en los mecanismos de fisiología bacteriana y de la interacción patógeno-hospedador, focalizándose particularmente en tres procesos: la regulación del sistema de secreción tipo VI (SST6) y su rol en la interacción bacteria-bacteria, el mecanismo de egreso luego de la invasión a células no fagocíticas y el modo de acción de la hemolisina ShIA.

En el primer capítulo, se determinó que *S. marcescens* expresa un SST6 y que la transcripción del mismo está activada de forma directa por RcsB, el regulador de respuesta del sistema Rcs, en respuesta a la presencia de bacterias agresivas. Esta inducción, observada en condiciones de competencia tanto inter como intraespecífica, es mayor cuando la bacteria antagonista es más agresiva y es producto de la acción específica de efectores translocados por el SST6 de la atacante. Este mecanismo regulatorio le otorgaría a *Serratia* una ventaja temporal en ambientes polimicrobianos, ya que es capaz de atacar a otras bacterias y, frente a un ataque, aumentar la transcripción de su SST6 para ser más agresiva.

El segundo capítulo de Tesis se enfocó en el análisis del mecanismo de egreso que utiliza *Serratia* luego de invadir células no fagocíticas. Se determinó que el factor responsable de este proceso es la hemolisina ShIA. La caracterización del mecanismo de egreso permitió concluir que es un proceso no lítico, ya que no se detectó daño a la célula hospedadora, y de tipo exocítico. Los resultados obtenidos permiten formular un modelo en el cual *S. marcescens* provoca un aumento localizado en la concentración de Ca^{2+} intracelular, de un modo dependiente de ShIA, estimulando la exocitosis de la vacuola en la cual está contenida.

Los resultados obtenidos en el segundo capítulo de Tesis destacan la importancia de ShIA como un blanco crítico para combatir las infecciones causadas por *Serratia*, por lo tanto en el tercer capítulo se propuso estudiar el mecanismo de acción de la hemolisina. Se demostró que el agregado de NiCl_2 bloquea, de forma reversible, los fenotipos dependientes de ShIA, sin afectar la expresión ni la secreción de la misma. Además, los resultados obtenidos permiten concluir que existen dos tipos de fenotipos dependientes de ShIA: los que son causados por *Serratia* intracelular son dependientes de Ca^{2+} ; y los fenotipos que están causados por la bacteria extracelular son independientes de las movilizaciones de Ca^{2+}

intracelulares. En conjunto, estos resultados permiten proponer que el uso controlado de Ni^{2+} para bloquear selectivamente ShIA podrá ser empleado como una herramienta para diseccionar el mecanismo de acción de la hemolisina.

ABSTRACT

Serratia marcescens is an ubiquitous bacteria that can be isolated from a wide variety of environmental niches, ranging from water and soil to air. It is a pathogen with a wide host range, being able to infect plants, vertebrates and invertebrates. Taken together, these particularities point to *Serratia* as a versatile organism, capable of deploying efficient adaptive strategies that allow it to subsist and proliferate in both abiotic and biotic environments, overcoming the challenges posed by adverse environmental conditions.

In this work we propose the use of *S. marcescens* as a model to study the mechanisms of bacterial physiology and host-pathogen interaction, focusing on three processes: the regulation of the type VI secretion system (T6SS) and its role in the bacteria-bacteria interaction, the mechanism of egress after the invasion of non-phagocytic cells and the mode of action of the ShIA hemolysin.

In the first chapter, we determined that *S. marcescens* expresses a T6SS and that its transcription is activated by RcsB, the response regulator of the Rcs system, in response to the presence of aggressive bacteria. This induction is greater when the antagonist bacterium is more aggressive and is the product of the specific action of effectors translocated by the SST6 of the attacker. This regulatory mechanism would give *Serratia* a temporary advantage in complex polymicrobial environments.

The second chapter focused on the analysis of the mechanism of egress that *Serratia* deploys after invading non-phagocytic cells. We determined that the factor responsible for this process is ShIA. The characterization of the exit mechanism allowed us to conclude that it is a non-lytic process, since no damage to the host cell was detected, and exocytic-like. The results allow us to formulate a model in which *S. marcescens* causes a localized increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} , in a ShIA-dependent manner, stimulating the exocytosis of the vacuole in which it is contained.

The results obtained in the second chapter of this Thesis highlight the importance of ShIA as a critical target to combat infections caused by *Serratia*, therefore in the third chapter we studied the mechanism of action of the hemolysin. We demonstrated that the addition of NiCl_2 reversibly blocks the ShIA-dependent phenotypes, without affecting the expression or secretion of the protein. In addition, the results allow us to conclude that there are two types of ShIA-dependent phenotypes: those that are caused by intracellular *Serratia* are dependent on Ca^{2+} ; and the phenotypes that are caused by extracellular bacteria are independent of intracellular Ca^{2+} mobilizations. Taken together, these results allow us to hypothesize that the

controlled use of Ni^{2+} to selectively block ShIA could be used as a tool to dissect the mechanism of action of the hemolysin.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. *Serratia marcescens*

I.1.1. Género *Serratia*

El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Sus miembros son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles y de flagelación peritrica. Son quimioorganotróficos y presentan metabolismos respiratorios y fermentativos. Miden entre 0,9 y 2,0 μm de largo y entre 0,5 y 0,8 μm de diámetro. Cepas de *Serratia* pueden ser aisladas de diversos nichos ambientales: agua, suelo y aire. Son patógenos con rangos de hospedador muy amplios, siendo capaces de infectar plantas, invertebrados y vertebrados (1).

Hay 14 especies y 2 subespecies que pertenecen al género *Serratia*: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens* subsp. *marcescens*, *S. marcescens* subsp. *sakuensis*, *S. nematodiphila*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea* y *S. ureilytica* (2). *S. marcescens* es la especie más estudiada del género.

Los microorganismos pertenecientes al género *Serratia* tienen características que les permiten sobrevivir en condiciones extremas y colonizar una gran variedad de nichos ecológicos: secretan exoproteínas, presentan múltiples resistencias a antibióticos, realizan motilidades tipo *swimming* o *swarming* dependiendo de la viscosidad del medio en el que se encuentran, producen metabolitos secundarios (como prodigiosina, en cepas pigmentadas, o biosurfactantes) y presentan comportamientos comunitarios, por ejemplo *quorum sensing* y producción de biopelículas. Se postula que dichas características también pueden presentar roles en la virulencia de *Serratia* o en la evasión del sistema inmune del hospedador (3).

I.1.2. Antecedentes históricos de *S. marcescens*

A principios de julio de 1819, en Legnaro, provincia de Padua, Italia, ocurrió un fenómeno que inquietó a muchos de los habitantes del área. Ese verano en particular había sido más húmedo y caluroso de lo habitual, y la polenta se tiñó de rojo. Los habitantes supersticiosos le temían a esta “polenta sangrienta” y pensaban que el origen de este fenómeno era diabólico. La policía formó una comisión de profesores de la Universidad de Padua para asesorar en la investigación. Independientemente de esta comisión, Bartolomeo Bizio realizó experimentos y, en una publicación anónima, concluyó que la polenta con tintes rojos era provocada por fenómenos naturales. En una publicación de 1823, Bizio determinó que la causa de la polenta roja era un organismo al cual denominó *Serratia marcescens*, en honor al físico italiano Sefarino Serrati. A ese nombre agregó *marcescens*, una palabra que proviene del latín “decaer” o “descomponer”, ya que observaba que el pigmento desaparecía rápidamente (4, 5).

Originalmente se creía que *Serratia* era un organismo saprófito acuático no patógeno y se usó como marcador biológico para estudiar la diseminación de microorganismos gracias a

sus colonias rojas fácilmente identificables. El primero de varios experimentos con *S. marcescens* como organismo de rastreo, fue realizado por M. H. Gordon en 1906. Se le pidió a Gordon que investigara la higiene atmosférica de la Cámara de los Comunes en Inglaterra, luego de un brote de gripe. Mientras la Cámara estaba vacía, Gordon colocó placas de Petri abiertas a su alrededor e hizo gárgaras con un cultivo líquido de *S. marcescens* para determinar la dispersión de los organismos mientras recitaba pasajes de Shakespeare. Se encontraron colonias de *S. marcescens* lo suficientemente alejadas de Gordon para demostrar que los microorganismos pueden dispersarse por el habla, además de propagarse mediante la tos y los estornudos (2).

En noviembre de 1976, el diario Newsday de Long Island publicó una nota en la cual describía pruebas que el gobierno de Estados Unidos realizó sobre la población de San Francisco y en el sistema de subterráneos de Nueva York. El objetivo de las mismas era determinar cuán vulnerables eran estas ciudades a ataques por armas biológicas y la viabilidad de los organismos usados en estos posibles ataques. El reporte mencionaba que al menos 5 pacientes presentaron infecciones causadas por el organismo utilizado en estas pruebas, *S. marcescens*, y la muerte de al menos un individuo por dichas infecciones. Desde 1960, la incidencia de esta bacteria en infecciones humanas ha incrementado, registrándose el surgimiento de numerosas cepas resistentes a múltiples antibióticos (2, 6).

En 2017, la Organización Mundial de la Salud publicó una lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Esta lista incluye 12 de las bacterias más peligrosas para la salud humana. El grupo de prioridad crítica, en el cual está incluido el género *Serratia*, incluye bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos, como ventiladores y catéteres (7).

I.1.3. Patogénesis de *Serratia*

Actualmente, *Serratia* es considerado uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en unidades de terapia intensiva y de cuidados neonatales. Estas infecciones son muy importantes debidas a su alta tasa de mortalidad, que es aún mayor cuando adquieren un carácter epidémico (8). Del total de los aislamientos provenientes de pacientes hospitalizados infectados por *Serratia*, la mayor parte corresponde a la especie *S. marcescens*, siendo escasos los reportes de infecciones causadas por *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. fonticola*, *S. ficaria*, *S. rubidaea*, *S. quinivorans* y *S. odorifera*. De modo que, *S. marcescens* se clasifica como un patógeno oportunista, siendo las personas inmunocomprometidas, los hospedadores más afectados. Sin embargo, las infecciones generadas por *S. marcescens* no siempre tienen un origen nosocomial (1, 9).

Como se mencionó previamente, la infección sucede frecuentemente en pacientes hospitalizados. Pueden darse infecciones de tracto urinario en pacientes con catéteres,

infecciones respiratorias en pacientes intubados, infecciones de heridas quirúrgicas, septicemia en pacientes con catéteres intravenosos, infecciones oculares, de piel, endocarditis, meningitis u osteomielitis, entre otras (1, 3, 8, 10–13). Gracias a su gran capacidad de adherencia y a la elevada resistencia a protocolos estándares de esterilización y desinfección, *Serratia* puede persistir en material hospitalario, catéteres, agujas, tubos intravenosos y endoscopios (14).

En general, las infecciones causadas por *S. marcescens* inducen inflamación y fiebre, pero pueden desarrollar bacteriemia fatal en pacientes debilitados por infecciones previas, cirugía o inmunosupresión. A pesar de haberse identificado diversos factores de virulencia potenciales producidos por *S. marcescens*, son escasas las publicaciones donde se exploran en profundidad los mecanismos que este patógeno utiliza para invadir, sobrevivir y proliferar dentro del hospedador.

Hertle y Schwartz reportaron que *S. marcescens* es capaz de invadir distintas líneas celulares epiteliales, por un mecanismo dependiente de la adhesión mediada por fimbrias y de la producción de hemolisina. Propusieron que dicha toxina facilitaría la internalización de la bacteria, pero no estaría involucrada en la replicación intracelular (15). En un reporte más reciente se demostró que distintos aislamientos clínicos no pigmentados de *S. marcescens* son citotóxicos ante distintas líneas celulares epiteliales y de macrófagos, y que esa citotoxicidad es dependiente del contacto entre las bacterias y las células eucariotas. Además, se reportó que *Serratia* es capaz de inducir necrosis y apoptosis dependiente de caspasas en estas líneas celulares (16, 17).

Kurz y colaboradores realizaron una búsqueda de factores de virulencia en *S. marcescens*, demostrando la capacidad de esta enterobacteria para invadir un amplio rango de hospedadores, tales como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y cultivos de células epiteliales. Reportaron que los genes implicados en la biosíntesis de lipopolisacárido (LPS), la captación de hierro y la producción de hemolisina son necesarios para la virulencia de *Serratia in vivo* (18). Recientemente, se identificó a *S. marcescens* como una de las especies microbianas más abundantes que colonizan el intestino de pacientes con enfermedad de Crohn, en detrimento de otras bacterias beneficiosas (19).

En nuestro laboratorio, se demostró previamente que *S. marcescens* es capaz de invadir células no fagocíticas por medio de la vía endosomal, y residir y multiplicarse dentro de grandes compartimentos rodeados de membrana denominados SeCV (del inglés *Serratia-containing vacuole*). Además, se reportó que la expresión flagelar está involucrada en los primeros pasos de la interacción bacteriana con la célula hospedadora. Las mutantes incapaces de sintetizar el regulador maestro FlhDC presentan una menor capacidad de adherencia e invasión, demostrando que la integridad de la cascada flagelar es necesaria para las interacciones tempranas de *Serratia* con la célula hospedadora (20). Según el modelo desarrollado en nuestro laboratorio, *Serratia* expresa la hemolisina ShIA induciendo el proceso de autofagia desde el espacio extracelular (21). Luego, el patógeno ingresa a la célula

hospedadora contenido en una vacuola con características de endosoma o fagosoma temprano, que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3) (20). Se demostró también que la mayor parte de las SeCV son no ácidas y que no tienen propiedades degradativas. Una población mayoritaria de las bacterias intracelulares se replica rápidamente y, mediante la intervención de genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ (22), se produce un bloqueo de la fusión con lisosomas. Otra población minoritaria del microorganismo no es capaz de escapar al mecanismo de defensa del hospedador y es degradado en compartimientos lisosomales. Como resultado, *Serratia* sería capaz de subvertir el proceso de autofagia celular, encontrando en los autofagosomas un nicho adecuado para su replicación intracelular.

I.1.4. Factores de virulencia

A pesar de la importancia de *S. marcescens* como causante de múltiples infecciones nosocomiales, son escasos los reportes de sus mecanismos de invasión y patogénesis. Se han identificado numerosos factores de virulencia potenciales; sin embargo, el rol de muchos de ellos no está completamente dilucidado. La patogénesis de *S. marcescens* es un proceso multifactorial en el cual se ven involucrados diversos factores de virulencia, entre los cuales se pueden mencionar: hemolisina, fimbrias, proteasas, lipasas, nucleasas, antígenos de pared celular, entre otros. La acción coordinada de estos factores resulta en adherencia, invasión a células hospedadoras, citotoxicidad y lisis celular (3, 23). A continuación, se efectúa una síntesis de los conocimientos más relevantes de algunos de estos factores.

I.1.4.1. Prodigiosina

Algunas cepas de *Serratia* pueden producir prodigiosina (2-metil-3-amil-6-metoxi-5-(2-pirril)-2,2'-dipirrilmeteno), un pigmento rojo no difusible cuya función aún es materia de debate. Dado que las cepas de aislamientos clínicos rara vez son pigmentadas, se postula que no tiene un rol relevante en la virulencia de *S. marcescens*. Este pigmento es un compuesto de bajo peso molecular y, debido a que es una molécula altamente hidrofóbica, se sugiere que está asociado a la envoltura celular. Su biosíntesis depende de las condiciones de crecimiento bacteriano: la iluminación, la temperatura y la presencia de NaCl, aminoácidos o glucosa (3).

La prodigiosina tiene un rol en la respiración y algunas propiedades antibióticas. Se postula que su biosíntesis actúa como un mecanismo protector cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables (3, 24). Otros reportes postulan que la prodigiosina tiene propiedades antifúngica, antibacteriana, antiprotozo, antimalaria, inmunosupresora, proapoptótica y antioncogénica (25).

I.1.4.2. Resistencia a antibióticos

Las infecciones causadas por *S. marcescens* suelen ser difíciles de tratar debido a las múltiples resistencias a antibióticos que presenta esta bacteria. Las cepas ambientales suelen

ser resistentes a penicilina G, macrólidos, clindamicina, glicopéptidos, rifampicina, amoxicilina, ampicilina, cefalosporinas, cefamicinas, colistina, tetraciclinas y nitrofurantoína. Dichas resistencias pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos (11, 14, 26).

El mecanismo más común de resistencia a aminoglicósidos en *S. marcescens* está mediado por enzimas que modifican el antibiótico, agregando grupos acetilos (N-acetiltransferasas), grupos fosfatos (O-fosfotransferasas) o nucleótidos (O-nucleótidotransferasas). De esta manera, el aminoglicósido es incapaz de unirse a su blanco en el ribosoma. La resistencia también puede estar dada debido a mecanismos bacterianos que provocan la alteración del ribosoma mismo, la impermeabilización de la célula o el aumento en la expresión de canales de eflujo. Dicha resistencia está generalmente codificada en un plásmido y, por lo tanto, puede transferirse y diseminarse, hecho que incrementa la gravedad de las infecciones ocasionadas por *Serratia* (26). Muchos brotes nosocomiales son causados por cepas de *S. marcescens* resistentes a uno o más aminoglicósidos (2).

Las especies del género *Serratia* son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos β -lactámicos como la penicilina G, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas (2, 27, 28). La resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. marcescens* viene dada por dos mecanismos: la expresión de β -lactamasas capaces de degradar antibióticos de la familia de las cefalosporinas, carbapenemes y penicilinas y, por otro lado, una menor permeabilidad de la membrana debido a modificaciones en el antígeno O del LPS (3).

La resistencia a tetraciclinas está dada principalmente por la expresión de bombas de eflujo específicas, pero también puede ser consecuencia de la presencia de una bomba de eflujo para múltiples drogas (28).

Las fluoroquinolonas ejercen su actividad bactericida inhibiendo la enzima ADN girasa bacteriana, necesaria para la replicación del ADN. Se reportó que la resistencia a estos antibióticos en *S. marcescens* puede ser resultado de mutaciones específicas en la ADN girasa que reducen la susceptibilidad de esta enzima a las fluoroquinolonas o por la sobreproducción de bombas de eflujo para múltiples antibióticos responsables de evitar la acumulación de los mismos en el interior de la bacteria (29).

I.1.4.3. Detección de densidad celular (*quorum sensing*)

La capacidad de comunicarse es esencial para las actividades bacterianas coordinadas. Muchos géneros bacterianos utilizan la comunicación célula-célula para monitorear la densidad poblacional, sincronizar sus comportamientos fisiológicos y llevar a cabo actividades colectivas. Esta comunicación, que tiene naturaleza química, se denomina *quorum sensing* y resulta en una regulación génica coordinada.

Los microorganismos son capaces de producir moléculas señales que se acumulan conforme la población aumenta y, al exceder la señal un valor umbral de concentración, se activa la expresión de diversos genes. De esta manera, se modulan procesos fisiológicos de

forma concertada a través de toda la población. Diversas especies bacterianas regulan mediante *quorum sensing* un amplio espectro de procesos importantes, incluyendo virulencia, producción de metabolitos secundarios y formación de biopelículas (30).

En bacterias gram-negativas, las señales de *quorum sensing* más comunes son las N-acil homoserin lactonas (aHSL), aunque han sido descritas otras moléculas señal, como el Autoinductor-2 (AI-2). Los fenotipos regulados en *Serratia* por aHSL son diversos y tienen una gran importancia biológica y ecológica (30, 31). Existen dos proteínas importantes en los sistemas de *quorum sensing* dependientes de aHSL: una generadora de la señal (aHSL sintasa) y un receptor específico para la aHSL, que además funciona como un regulador transcripcional. Estas dos proteínas son homólogas a LuxI y LuxR de *Vibrio fischeri*, respectivamente (32).

En *S. marcescens* se han reportado dos sistemas de *quorum sensing* de tipo LuxIR. Por un lado, el sistema SwrIR induce la producción de biosurfactantes y exoproteínas, la motilidad de tipo *swarming* y la formación de biopelículas. El gen *swrI* codifica para la aHSL sintasa y el gen *swrR*, para un polipéptido que presenta un alto grado de similaridad con los miembros de la familia de LuxR (32). Por otro lado, en el sistema SpnIR, SpnI es responsable de sintetizar C6-HSL y 3-oxo-C6-HSL y éstas, al interactuar con el regulador negativo SpnR, derreprimen la síntesis de prodigiosina, en cepas pigmentadas, y de biosurfactante (31).

Tanto en bacterias gram-negativas como gram-positivas, existe un sistema de *quorum sensing* de tipo LuxS, dependiente de AI-2. Esta señal es universal, a diferencia de las aHSL, y se postula que dicha universalidad puede servir para la comunicación intra e interespecie. LuxS es la proteína responsable de la producción del AI-2 y, en condiciones de alta densidad celular, el autoinductor se une al sensor LuxP iniciando una cascada de transducción de señales que finaliza con la activación del regulador transcripcional LuxR (33). En *S. marcescens*, este sistema está involucrado en la producción de hemolisina y prodigiosina, en cepas pigmentadas, y en el mecanismo de virulencia de la bacteria en *C. elegans* (34).

I.1.4.4. Flagelo

El flagelo es la organela responsable de la locomoción en muchas especies bacterianas. Los flagelos bacterianos están compuestos por un cuerpo basal, que lo ancla a la envoltura celular bacteriana y contiene el motor que impulsa la rotación flagelar; el gancho, una varilla curvada y flexible que convierte el movimiento rotacional en olas; y un largo filamento helicoidal, que propaga las olas iniciadas por el gancho y propulsa a la bacteria a través del medio líquido en el que se encuentra. Tanto el filamento como el gancho son estructuras cilíndricas huecas que se extienden desde la superficie celular. A través de ellas, se translocan y autoensamblan en el extremo distal los componentes proteicos del flagelo.

La expresión de los genes flagelares está regulada en múltiples niveles en respuesta a señales ambientales y señales acopladas al desarrollo morfológico de la organela flagelar,

permitiendo que las proteínas flagelares sean producidas en el momento exacto en que son requeridas (35). Dentro del regulón, los operones están divididos en tres clases de distinta jerarquía transcripcional temporalmente reguladas: clases temprana, media y tardía. El operón del regulador maestro flagelar *flhDC* es el único miembro de la clase temprana de genes. Su expresión responde a numerosas señales globales a través de una serie de reguladores como las proteínas de shock térmico DnaK, DnaJ y GrpE, que responden a cambios en temperatura; OmpR, que responde a osmolaridad; H-NS, que responde a cambios en pH; AMPc-CRP, que responde a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono y el sistema RcsCDB, que responde a estrés de la envoltura celular, entre otros factores (36). Las proteínas FlhD y FlhC forman el complejo heterotetramérico FlhC₂D₂ que actúa como activador transcripcional de los operones de clase media. Esta activación es dependiente de la ARN polimerasa asociada a la subunidad σ^{70} (37). Los productos proteicos de los operones de clase media incluyen proteínas necesarias para la estructura y ensamblaje del cuerpo basal, así como también dos reguladores transcripcionales: FliA y su regulador negativo, FlgM. *fliA* codifica para una subunidad σ alternativa de la ARN polimerasa, σ^{28} , que le confiere especificidad para los promotores flagelares de los genes tardíos (36).

En nuestro laboratorio, se determinó que, en *S. marcescens*, el regulador RcsB es capaz de inhibir la transcripción del regulador maestro *flhDC* y, por lo tanto, inhibir la biosíntesis del flagelo (38).

I.1.4.5. Motilidad de tipo *swimming* y *swarming* y producción de biosurfactantes

S. marcescens puede llevar a cabo dos tipos de motilidad mediadas por flagelo dependiendo de la viscosidad del medio en el cual se encuentra. Si el medio es líquido, la bacteria presenta forma de bacilos cortos y un comportamiento de *swimming* mediado por uno o dos flagelos polares. Este movimiento es individual y desordenado, alternando nados suaves y giros cortos. Si se la transfiere a un medio semisólido, *S. marcescens* sufre un proceso de diferenciación celular: se elonga y expresa más flagelos en sus laterales. Luego de esta morfogénesis, muchas células quedan unidas a otras resultando en grandes grupos de células multinucleadas, aseptadas y multiflageladas (39). Gracias a dicha unión y a la presencia de múltiples flagelos, pueden moverse más rápidamente por una superficie semisólida. Cuando se las observa al microscopio, las células que hacen *swarming* presentan un movimiento en grupos coordinado. Si las células que están haciendo *swarming* se transfieren a un medio líquido, se fragmentan y atraviesan un proceso morfológico hasta adquirir las características de las células que hacen *swimming*. Por lo tanto, se postula que el proceso de diferenciación es reversible (40).

En *S. marcescens*, el proceso de diferenciación celular de aquellas células que hacen *swarming* está bajo el control de dos reguladores maestros. Por un lado, existe un control biosintético por el regulador transcripcional maestro FlhDC. Éste regula la biosíntesis completa

del flagelo, por lo tanto, una mutante en el operón *flhDC* es inmóvil porque no hay expresión flagelar (32, 39). Por otro lado, hay un control metabólico llevado a cabo por el sistema de *quorum sensing* SwrIR. Además, hay una termorregulación del movimiento de tipo *swarming*, siendo activado a 30°C y reprimido a 37°C (41, 42).

La habilidad de sintetizar compuestos que reducen la tensión superficial está muy distribuida entre las bacterias, ya que permite que se facilite la translocación sobre superficies sólidas. Hasta el momento hay descritos tres lípidos con actividad biosurfactante que produce *S. marcescens* denominados serrawetinas W1, W2 y W3. Todos ellos tienen estructuras ciclolípídicas similares, pero cada cepa es capaz de secretar sólo uno de ellos (43). Se observó que a 30°C, *S. marcescens* presenta actividad biosurfactante; sin embargo, esta actividad no se observa a 37°C, por lo tanto este proceso estaría termorregulado (44). Asimismo, se reportó que el gen *swrA*, está implicado en la síntesis de serrawetina W2 y es controlado por *quorum sensing* (45). Por lo tanto, cuando la densidad celular aumenta, *Serratia* secreta serrawetina W2 reduciendo la tensión superficial del medio y permite la diferenciación celular y el movimiento coordinado tipo *swarming* (46).

I.1.4.6. Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades sésiles en las cuales los microorganismos se encuentran unidos a una superficie y embebidos en una matriz de exopolisacárido producido por las mismas bacterias. La formación de biopelículas es un comportamiento bacteriano multicelular muy importante ya que le proporciona la capacidad de resistir el estrés ambiental, la acción de antimicrobianos y las respuestas del hospedador (46). La capacidad de *S. marcescens* de adherirse tanto a superficies bióticas como abióticas le confiere una ventaja, ya que puede formar biopelículas sobre material hospitalario y, posteriormente, adherirse a los tejidos del hospedador (47).

Por análisis microscópicos se han determinado cinco etapas en el desarrollo de una biopelícula: unión inicial a la superficie, producción de exopolisacárido, desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula, maduración de la misma y dispersión de las células individuales en la biopelícula madura (48). Durante la formación de la biopelícula, *S. marcescens* sufre una diferenciación celular: las células adquieren una apariencia filamentosa, hay una agregación de células vegetativas y un entrecruzamiento de cadenas celulares durante la maduración del mismo (47, 49).

La relación entre la formación de biopelícula y otros comportamientos multicelulares, como la motilidad de tipo *swarming*, es compleja. Ambos involucran componentes similares; por ejemplo, en la primera etapa del desarrollo de un biopelícula se requiere el flagelo y la motilidad bacteriana es crucial en el establecimiento de la arquitectura de la biopelícula. Sin embargo, en ciertas etapas la bacteria debe elegir entre la motilidad o la formación de comunidades sésiles. Para ello, utilizan mecanismos de detección e integración de señales ambientales y fisiológicas.

Como se mencionó anteriormente, el sistema de *quorum sensing* SwrIR regula la motilidad de tipo *swarming* y la maduración de la biopelícula (49).

I.1.4.7. Exoproteínas

S. marcescens secreta múltiples enzimas hidrolíticas y se reportó que muchas de ellas tienen roles como factores de virulencia. Entre ellas se pueden destacar varias proteasas, una nucleasa, una lipasa, una fosfolipasa y una hemolisina, que es de gran importancia en el desarrollo de esta Tesis y será tratada en detalle en la sección I.4.

S. marcescens posee un sistema de secreción de tipo I denominado Lip que es responsable de la secreción de las metaloproteasas PrtA y SlpB, la lipasa LipA y la proteína de Capa S SlaA (50, 51). La lipasa LipA, también llamada triacilglicerol acilhidrolasa, cataliza la hidrólisis de triacilglicerol, dando como productos glicerol y ácidos grasos (52). El gen *slaA* codifica para un polipéptido parcialmente similar a la proteína de Capa S de *Caulobacter crescentus*. Las proteínas de Capa S son glicoproteínas que se encuentran en la superficie bacteriana formando una estructura altamente ordenada que cubre la envoltura celular (53). Las metaloproteasas PrtA y SlpB provocan citotoxicidad en líneas celulares (51, 54) y PrtA es capaz de inducir respuesta inflamatoria en el hospedador (55). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que PrtA está involucrada en la formación de biopelículas en *S. marcescens* (56).

La fosfolipasa PhIA se co-expresa con los genes flagelares y requiere del flagelo para su exporte (57, 58). Si bien no se ha dilucidado el rol patogénico de esta fosfolipasa, se reportó que PhIA tiene actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos y citotóxica sobre células epiteliales (59). Sin embargo, en el modelo de invasión de células CHO utilizado en el laboratorio, la expresión de PhIA no es requerida ni para la invasión y replicación en estas células ni para el disparo de autofagia (20, 21) y según lo reportado por nuestro grupo de trabajo tampoco sería necesaria para la actividad hemolítica en medio líquido (21).

S. marcescens secreta una nucleasa con capacidad de degradar ARN y ADN tanto simple como doble hebra (60). Las bacterias pueden degradar ácidos nucleicos y usar ribosa o desoxirribosa como fuente de energía y nucleótidos para la síntesis de ADN y ARN. Se postula que ésta es la razón principal por la cual *S. marcescens* secreta una nucleasa (61).

I.2. Sistemas de Secreción de Tipo VI

Las bacterias gram-negativas han desarrollado una amplia variedad de maquinarias macromoleculares denominados sistemas de secreción, los cuales transportan, a través de la envoltura bacteriana, un amplio rango de sustratos, incluyendo pequeñas moléculas, proteínas y ADN. Dichos sustratos cumplen un rol clave en la respuesta de la bacteria a su ambiente y también en muchos procesos fisiológicos, como ser adhesión, patogenicidad, adaptación y supervivencia. Dependiendo de la naturaleza de la maquinaria y del mecanismo de transporte, estos sistemas se numeran del 1 al 9 (62, 63).

Los sistemas de secreción de tipo VI (SST6) son maquinarias multiproteicas ampliamente distribuidas en Proteobacterias, especialmente en γ -proteobacterias (63). El ensamblado de estos sistemas requiere de 13 subunidades que generalmente se codifican en un único *cluster* génico. Además, en el mismo *cluster* puede haber genes que codifican para efectores y sus proteínas de inmunidad asociadas, proteínas adaptadoras y reguladores. El contenido de GC de estas regiones suele ser distinto al del resto del genoma, sugiriendo que podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal génica. Adicionalmente al *cluster* génico principal, suele haber otros genes codificando para proteínas Hcp, VgrG y putativos efectores (64). Diversas cepas bacterianas poseen más de un SST6 codificado en sus genomas. Esta multiplicidad puede corresponder a sistemas con distintas funciones o sujetos a mecanismos regulatorios diferentes (63).

I.2.1. Estructura y mecanismo de acción

Básicamente, los SST6 están formados por una estructura tipo aguja anclada a la membrana bacteriana por un complejo que atraviesa su envoltura, denominado complejo de membrana. En la Figura I.1 se muestra un esquema del SST6. Los componentes estructurales del SST6 se denominan Tss, del inglés *type six secretion*. La estructura mínima del complejo de membrana está compuesta por las proteínas TssJ, TssL y TssM. TssM y TssL son proteínas de membrana interna que presentan homología a los componentes del SST4 IcmF y DotU, respectivamente. TssM conecta TssL con una lipoproteína de membrana externa denominada TssJ (65–67).

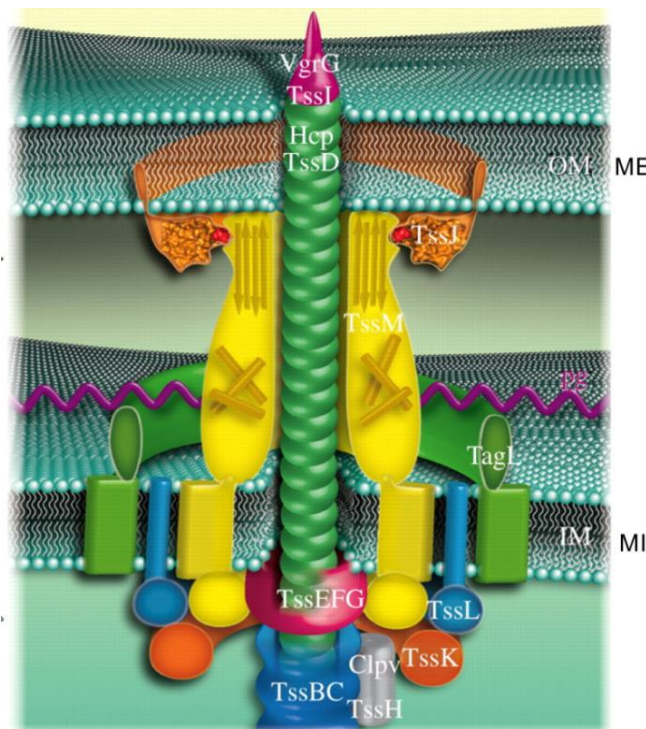


Figura I.1. Esquema de la estructura de los SST6. ME: membrana externa. MI: membrana interna. Adaptado de Cascales y Cambillau, 2012 (68).

La estructura tipo aguja está evolutiva, estructural y funcionalmente relacionada con el complejo de inyección del bacteriófago T4, y está compuesta por el tubo interno de Hcp (TssD) y envuelta en una estructura contráctil formada por las proteínas TssB y TssC, denominada

vaina. El complejo base está formado por TssE, TssF, TssG y TssK. Se postula que el complejo base es responsable de la conexión del complejo de membrana con el tubo interno y la vaina (63, 65). De hecho, se demostró que la proteína citoplasmática TssK interactúa con TssL, TssB y Hcp (69).

El modelo descrito para el mecanismo de acción de los SST6 se muestra en la Figura I.2. La biogénesis de los SST6 se inicia con el ensamblado del complejo de membrana: TssJ recluta a TssM y posteriormente TssL es adicionada. El complejo base se ensambla de forma independiente y es reclutado al complejo de membrana luego de la formación de ambos complejos (Figura I.2A). Hcp forma anillos hexaméricos que polimerizan para formar el tubo interno y es cubierto en su extremo por un trímero de VgrG. La vaina, compuesta por las proteínas TssBC, polimeriza alrededor del tubo interno. Durante el ensamblado del sistema, los efectores son cargados en el interior del tubo o asociados con VgrG (Figura I.2B y C). La contracción de la vaina de TssBC impulsa la eyección del tubo interno permitiendo la perforación de la membrana de la célula blanco y la translocación de los efectores (Figura I.2D). La vaina contraída es desensamblada y reciclada por la ATPasa ClpV (Figura I.2E y F) (63, 65, 67, 68, 70, 71).

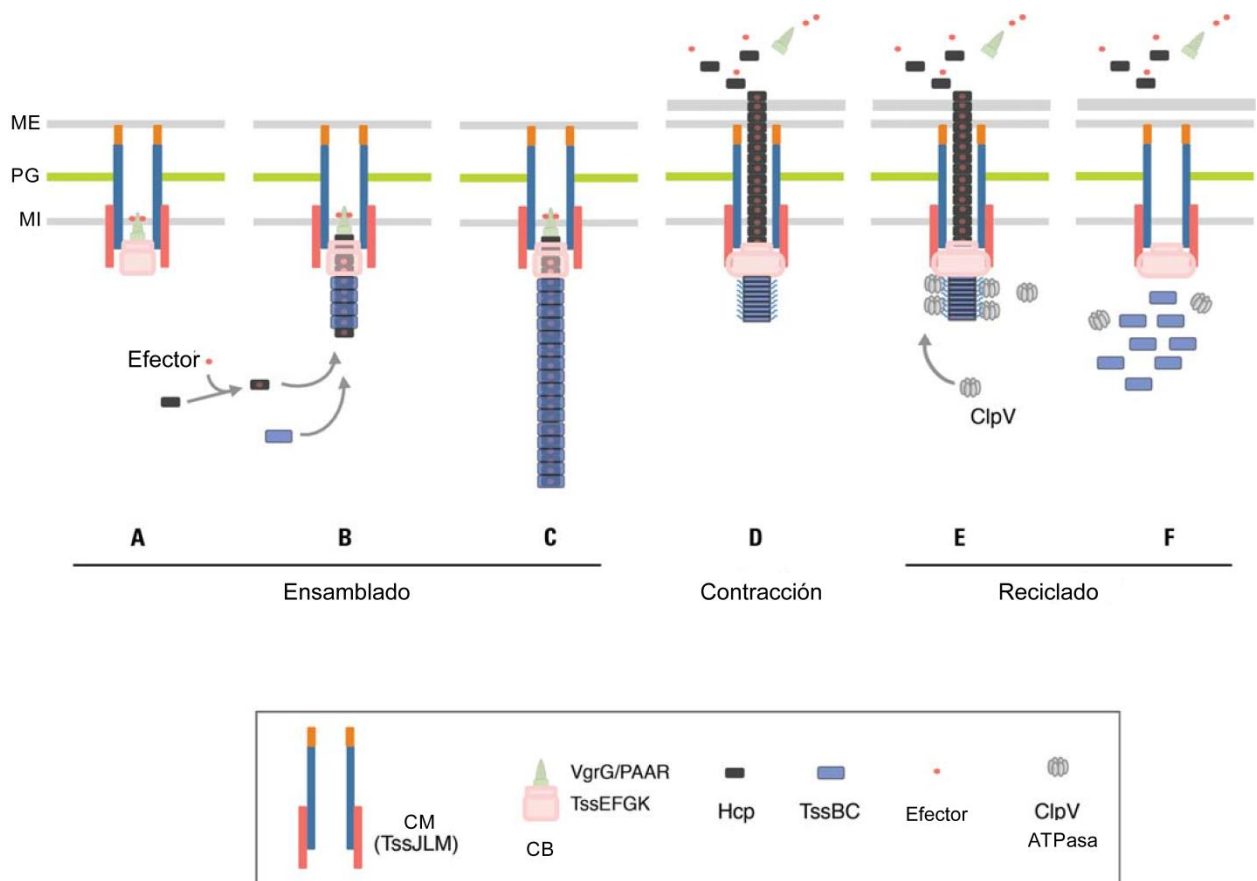


Figura I.2. Mecanismo de acción del SST6 propuesto. CM: complejo de membrana. CB: complejo base. ME: membrana externa. MI: membrana interna. PG: peptidoglicano. Adaptado de Journet y Cascales, 2016 (63).

I.2.2. Efectores y función del SST6

Los SST6 permiten la translocación de proteínas efectoras tóxicas a la célula blanco en

un proceso dependiente de contacto. En los últimos años se reportaron una gran variedad de efectores, incluyendo proteínas que interaccionan con el citoesqueleto de actina de la célula blanco, nucleasas, fosfolipasas e hidrolasas de peptidoglicano. Por lo tanto, los SST6 son armas versátiles que permiten atacar tanto células eucariotas, procariotas o ambos tipos celulares (70). Si bien la translocación de efectores a la célula blanco resulta generalmente en la eliminación de dicha célula, no todos los efectores secretados por SST6 son tóxicos. En *Yersinia pseudotuberculosis*, el efector YepZ actúa como una proteína de unión a Zn^{2+} otorgándole la capacidad de sobrevivir en condiciones de estrés (72).

Los efectores pueden ser clasificados por su mecanismo de secreción, según se encuentren libremente en el lumen del tubo de Hcp, unidos a VgrG de forma directa o mediante proteínas adaptadoras o como un dominio de VgrG (63). El primer tipo de efector descrito fueron las proteínas “VgrG evolucionadas” de *Vibrio cholerae*, con un dominio C-terminal que estimula el entrecruzamiento con actina (73). Posteriormente, se caracterizaron otras VgrG evolucionadas con dominios que permiten la fusión de membranas (74) o la hidrólisis de peptidoglicano (75), entre otras. La secreción de otros efectores depende de la interacción con una proteína VgrG en particular, como TseL de *V. cholerae* (75) o Tse5 y Tse6 de *Pseudomonas aeruginosa* (76). Recientemente, se reportó la existencia de chaperonas que cargan los efectores a la proteína VgrG correspondiente en *V. cholerae* (77, 78). La proteína Hcp posee actividad chaperona y puede unir pequeños efectores en *Agrobacterium tumefaciens* y *P. aeruginosa* (79, 80).

Los SST6 pueden tener roles directos o indirectos en virulencia. En *Escherichia coli*, se demostró que el SST6 está directamente involucrado en la adhesión a células hospedadoras y la supervivencia en macrófagos (63, 81, 82). Además, en *V. cholerae*, el SST6 interfiere con la dinámica del citoesqueleto, de un modo dependiente del dominio C-terminal de VgrG1, impidiendo el movimiento celular y la fagocitosis (73, 83). Adicionalmente, se describieron otros efectores con actividad antieucariótica incluyendo fosfolipasas en *P. aeruginosa* (84) y proteínas que inducen la fusión de membranas en *Burkholderia* (74) o interfieren con la dinámica de los microtúbulos (85). Adicionalmente, se reportó que el SST6 de *E. coli* tiene un rol en formación de biopelículas (86).

A pesar de todos estos hallazgos, el rol directo del SST6 en virulencia se ha visto opacado, ya que la mayor parte de los sistemas descubiertos tienen un rol en competencia interbacteriana. Los SST6 permiten la translocación de efectores al citoplasma o periplasma de la bacteria blanco, con diversas actividades incluyendo amidasas, fosfolipasas, muramididasas y nucleasas (63, 70, 87). Los efectores se suelen denominar respecto a su actividad: si tienen actividad amidasa se denominan Tae (del inglés *type VI secretion amidase effector*), si actúan como lipasas se denominan Tle (del inglés *type VI secretion lipase effector*) y si poseen actividad nucleasa se denominan Tde (del inglés *type VI secretion DNase effector*) (88). La célula que produce los efectores y sus células hermanas están protegidas de la acción de los

mismos gracias a la expresión de proteínas de inmunidad, que inhiben la actividad del efector, generalmente uniéndose al mismo. Las proteínas de inmunidad están codificadas por genes que, por lo general, se encuentran formando un operón con el gen que codifica para el efector y por lo tanto son co-expresados (70, 87, 89). La competencia interbacteriana ofrece una ventaja adaptativa especialmente en ambientes complejos o en infecciones polimicrobianas.

I.2.3. Regulación del SST6

Se postula que la elaboración y el uso del SST6 es energéticamente costoso para la bacteria, por lo tanto que la expresión y el ensamblado del mismo debería estar sujeto a mecanismos regulatorios precisos (70). Hay reportes que indican que el SST6 está regulado transcripcionalmente por *quorum sensing* (90) o que la expresión del mismo se regula durante la formación de biopelículas (91), en condiciones limitantes de hierro (92), frente a cambios en la osmolaridad del medio (93) y en condiciones de estrés (94).

Las condiciones que controlan la actividad del SST6 pueden dar información sobre la relevancia fisiológica de estos sistemas. El SST6-H1 de *P. aeruginosa* y el de *V. cholerae* son reprimidos por *quorum sensing* (95, 96). Esta represión indica que estos sistemas serían activos cuando la densidad celular es relativamente baja y que podrían funcionar para eliminar bacterias poco relacionadas. En contraposición, el SST6-H2 de *P. aeruginosa* se activa a altas densidades celulares (96), indicando que tiene un rol en competencia intraespecífica.

La regulación del SST6-H1 de *P. aeruginosa* está muy bien caracterizada. Este sistema tendría una función defensiva, ya que *P. aeruginosa* es capaz de eliminar una bacteria que posee un SST6 funcional, pero esta eliminación no es observada cuando la presa es indefensa. Este contraataque direccionado hacia la bacteria agresora y originado en el sitio de perturbación de membrana se denominó “duelo” (97). Este nivel de regulación está constituido por la vía de fosforilación de treonina, en la cual la fosforilación de la proteína Fha1 dispara el ensamblado del sistema y la secreción de los efectores. PppA es una fosfatasa cuya actividad sobre Fha1 se contrapone a la de la quinasa PpkA. Otros genes involucrados en esta vía regulatoria son los genes *tagQRST* y actúan corriente arriba de los mencionados anteriormente. Se describieron al menos dos señales activadoras de la vía de fosforilación de treonina: el crecimiento asociado a superficie y la perturbación de membranas, ya que el tratamiento con el péptido antimicrobiano polimixina B y el contacto con el pili de *E. coli* también inducen la actividad del SST6 (98, 99). Trabajos más recientes describieron un segundo nivel de regulación en el cual la liberación de una señal difusible de una bacteria hermana lisada lleva a la activación post-traducciona del SST6 mediante la vía Gac/Rsm (100). Esta vía, además de controlar la actividad del SST6, regula numerosos factores relacionados con el antagonismo o el comportamiento social en *Pseudomonas* (70).

I.2.4. SST6 de *S. marcescens*

En 2011 se reportó que *S. marcescens* Db10 posee un SST6 cuya función principal es

la eliminación de otras bacterias, siendo irrelevante para la virulencia en los modelos *C. elegans*, *Galleria mellonella* y *Dictyostellium discoideum*. Además, sugirieron que la expresión del SST6 es similar al cultivar las bacterias en diferentes condiciones (medio rico/medio mínimo, a distintas temperaturas y medio líquido/medio sólido). Finalmente, demostraron que el *cluster* génico que codifica para los componentes estructurales corresponde a una única unidad transcripcional (101). En trabajos sucesivos, el mismo grupo de trabajo reportó que *Serratia* secreta, de un modo dependiente de su SST6, los efectores Ssp1, Ssp2, Ssp3, Ssp4, Ssp5, Ssp6 (del inglés *small secreted protein*), Rhs1, Rhs2 (del inglés *recombination hot spot*), Slp (del inglés *secreted lipase-like protein*) y Tfe2 (del inglés *type-VI antifungal effector*). Se postuló que los efectores Ssp1-6, Rhs1-2 y Slp tienen actividad antibacteriana y que Ssp3 y Tfe2 tienen un rol en la competencia antifúngica (102–106).

Los genes que codifican para Ssp1 y Ssp2 se encuentran dentro del *cluster* génico que codifica para los componentes estructurales del SST6 junto a sus putativas proteínas de inmunidad asociadas Rap1a, Rap1b, Rap2a y Rap2b (del inglés *resistance associated protein*). Se predijo que las proteínas Rap1a, Rap1b, Rap2a y Rap2b son periplasmáticas y que interactúan directamente con la proteína Ssp correspondiente (102). Posteriormente, se demostró que Ssp1 y Ssp2 son hidrolasas de peptidoglicano (107). Los genes que codifican para Ssp3, Ssp4, Ssp5 y Ssp6 se encuentran fuera del *cluster* génico del SST6 y, a excepción de *ssp6*, se encuentran en operones policistrónicos con genes que codifican para sus putativas proteínas de inmunidad (Sip3, Sip4, Sip5a y Sip5b, del inglés *Ssp-associated immunity protein*). Además, predijeron que estos efectores actúan en citoplasma, excepto Ssp4 que parecería ser periplasmática (103). Por otro lado, las Rhs son proteínas grandes y polimórficas, con su extremo C-terminal responsable de diversas actividades tóxicas. Se predice que Rhs2 tiene actividad ADNasa y que Rhs1, con actividad aún desconocida, actúa en el citoplasma. Corriente abajo de los genes que codifican para las proteínas Rhs se encuentran genes codificantes para proteínas de inmunidad (RhsI1 y RhsI2) (104). Recientemente, se reportó que la proteína Slp podría tener actividad lipasa o fosfolipasa (106).

En un trabajo reciente, Trunk y colaboradores reportaron que el SST6 de *S. marcescens* Db10 puede actuar contra hongos, incluyendo especies patogénicas de *Candida*. Los efectores Tfe1 (llamado previamente Ssp3) y Tfe2 tienen distinto impacto sobre el hongo, pero ambos ocasionan la eliminación del mismo. Se postula que Tfe2 interrumpe la captación de nutrientes y el metabolismo de aminoácidos en las células del hongo, mientras que Tfe1 ocasiona una pérdida de potencial de membrana plasmática (105).

Respecto a la regulación del SST6, Fritsch y colaboradores reportaron que, en *S. marcescens* Db10, la vía de fosforilación de treonina descrita previamente tiene un rol, pero que difiere de la reportada para *P. aeruginosa*. La fosforilación de Fha es dependiente de la quinasa PpkA y lleva a la activación del SST6. La fosfatasa PppA sería la encargada de revertir esta modificación, apagando el sistema. Sin embargo, la señal y el mecanismo de activación de

PpkA es distinto al reportado previamente (103). Posteriormente, el mismo grupo de trabajo reportó que el SST6 de *S. marcescens* Db10 se ensambla y permite la translocación de efectores estocásticamente, sin necesitar contacto célula-célula, lo que indicaría que el sistema tiene una función más agresiva que defensiva. En ese trabajo se señaló que este mecanismo le otorgaría a *Serratia* una ventaja adaptativa temporal, ya que no debe esperar una agresión para atacar, si bien sería energéticamente más costoso (108).

I.3. Sistemas de dos componentes

Las bacterias monitorean permanentemente las condiciones extracelulares y modifican su fisiología para adaptarse a cambios medioambientales. Esto es particularmente relevante en bacterias patógenas que han desarrollado evolutivamente la capacidad de colonizar, proliferar y diseminarse en diferentes nichos del organismo hospedador, ya que la regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones ambientales o de estrés tiene un rol crítico en la habilidad del patógeno para causar enfermedad. En eubacterias, uno de los mecanismos adaptativos más eficientes y ubicuos está constituido por sistemas de transducción de señales, predominando los “sistemas regulatorios de dos componentes” (TCS, del inglés *two-component system*). Están presentes tanto en bacterias gram-positivas como gram-negativas, y se estima que las bacterias entéricas albergan alrededor de 50 TCS diferentes que median la respuesta a una variedad de señales (109, 110).

Los TCS clásicos están compuestos básicamente por una proteína histidina quinasa sensora de membrana (HQ) y un regulador de respuesta citosólico (RR), ensamblados de acuerdo a un diseño en módulos. Una proteína sensora típica consiste en un dominio sensor N-terminal variable conectado al dominio C-terminal conservado que cataliza la fosforilación. Por su parte, una proteína reguladora de respuesta típica consiste en un dominio receptor conservado N-terminal y un dominio regulador C-terminal variable. Ante la presencia de un estímulo ambiental detectado por el dominio sensor, se induce la autofosforilación de un residuo de histidina conservado en el dominio catalítico de la HQ. Posteriormente, este grupo fosfato es transferido al dominio receptor de RR, ocasionando un cambio conformacional que lleva a la activación del dominio regulador del mismo. El regulador de respuesta activado tiene mayor afinidad por el ADN y funciona como modulador transcripcional. La posterior hidrólisis del grupo fosfato reinicia el sistema y le permite responder a nuevos estímulos (109, 110).

Además de los TCS clásicos, existen también sistemas no ortodoxos, comúnmente denominados de fosfotransferencia o *phosphorelay*. En estos sistemas, el grupo fosfato es transferido alternando entre varios residuos de histidina y aspartato presentes en dominios que pueden estar en proteínas individuales o formando parte de proteínas multidominios. La mayoría de estos sistemas posee histidina quinasas híbridas, las cuales se autofosforilan y transfieren el fosfato a un residuo de aspartato en un dominio receptor interno, en lugar de transferirlo a una proteína separada. Luego, el fosfato es subsecuentemente transferido a una

proteína histidina fosfotransferasa (HPt), que posee el residuo de histidina fosforilable pero carece de actividad autocatalítica, por lo que sólo sirve como intermediario en estas vías. Finalmente, el fosfato es transferido al RR. Se desconoce por qué algunos sistemas de transducción de señales usan fosfotransferencias simples y otros, pasos múltiples. Una posibilidad es que los pasos intermediarios del *phosphorelay* proporcionen puntos adicionales para la regulación de la vía en función de diversos estímulos ambientales y, como consecuencia, diferentes señales podrían definir la respuesta regulatoria (109, 110).

La gran mayoría de los RR son activos cuando están fosforilados (111), por lo tanto cualquier condición que afecte su estado de fosforilación impactará en su habilidad de ejercer su función biológica. En consecuencia, la respuesta del TCS no solo depende de la presencia de señales específicas detectadas por la HQ, sino también de otras proteínas que estimulen o inhiban la fosforilación del RR. Tales proteínas pueden tener como blanco cualquiera de los pasos que llevan a la fosforilación del RR, tales como la autofosforilación de la HQ, la fosfotransferencia al RR, la defosforilación del RR fosforilado y la actividad del dominio regulador del mismo. A su vez, los RRs pueden poseer una actividad autofosfatasa que limita el tiempo de vida de su estado fosforilado. En algunos sistemas, existen fosfatasas auxiliares o proteínas que refuerzan la actividad fosfatasa del RR, acelerando su defosforilación. Muchas HQs, además de la actividad de fosfotransferencia, también poseen actividad fosfatasa (112).

I.3.1. Sistema RcsCDB

El sistema de fosfotransferencia Rcs (del inglés *regulation of capsular synthesis*), se descubrió como regulador positivo del operón *cps*, que codifica para las enzimas que intervienen en la síntesis de la cápsula de ácido colánico en *E. coli*. Los genes del sistema Rcs están codificados en una misma región del genoma y ocupan un mismo locus génico. Hasta el presente, homólogos a los genes *rcs* se han hallado exclusivamente en la familia *Enterobacteriaceae* (113, 114). Este sistema es una compleja ruta de señalización compuesta por tres proteínas separadas. La proteína sensora RcsC, es una quinasa híbrida que contiene el dominio transmisor H1 y el dominio receptor D1, RcsD, que contiene el dominio de fosfotransferencia HPt, y el regulador de respuesta RcsB, que presenta un dominio receptor conservado D2. RcsC y RcsD son proteínas transmembranas ancladas a la membrana interna bacteriana, mientras que RcsB es de localización citoplasmática (Figura I.3). Luego que RcsC detecta una determinada señal, se fosforila el residuo conservado de histidina presente en el dominio H1 por medio de un evento de autofosforilación. El grupo fosfato es transferido al residuo de aspartato del dominio D1, posteriormente, al residuo de histidina en el dominio HPt de RcsD, y finalmente al aspartato del dominio D2 de RcsB (Figura I.3). El regulador RcsB fosforilado, es capaz de regular la transcripción de sus genes blanco. Adicionalmente, el sistema Rcs interacciona con proteínas auxiliares: RcsA, una proteína de unión al ADN que actúa como co-regulador de RcsB para el control de un subconjunto de genes del regulón, y la

proteasa Lon, que regula la estabilidad de RcsA. Por otro lado, RcsF es una lipoproteína de membrana externa que canaliza ciertas señales a RcsC y la proteína IgaA (localizada en la membrana interna) actúa como inhibidor de RcsC (Figura I.3). (113–116). La proteína RcsB, puede ejercer su función reguladora uniéndose a las secuencias promotoras de los genes blanco en formando homodímeros o heterodímeros, con proteínas reguladoras auxiliares, como ser RcsA, GadE, BglJ, entre otras (113, 114). Esta complejidad permite que RcsB regule más de 600 genes en respuesta a diferentes señales de estrés.

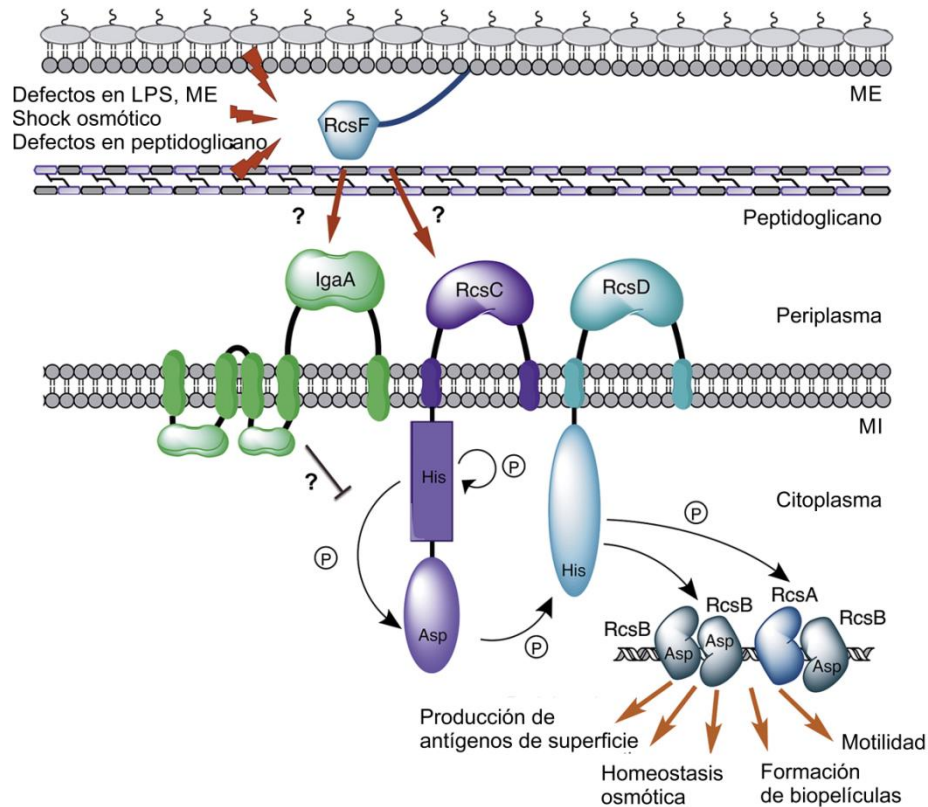


Figura I.3. Esquema del sistema de fosfotransferencia Rcs. Las flechas curvas indican la transferencia del grupo fosfato desde el dominio H1 de la quinasa RcsC, involucrando el dominio HPT de la proteína RcsD, al dominio receptor D2 del regulador de respuesta RcsB. RcsB en su estado fosforilado modula la expresión de sus genes blanco ya sea en forma de homodímero o heterodímero. Adaptado de Cho y colaboradores, 2014 (117).

Las condiciones activadoras del sistema Rcs descritas hasta el momento son muy heterogéneas. Por ejemplo, se observó que la sobreexpresión de DjIA, una proteína chaperona localizada en la membrana lleva a la activación del sistema Rcs, como así también las deleciones o mutaciones de los genes *dsbA*, *mdoH* y del locus *rfa*. DsbA está implicada en el correcto plegamiento de proteínas periplasmáticas, MdoH produce oligosacáridos derivados de membrana y el locus *rfa* es necesario para la biosíntesis del LPS (118–120). Además, se observó que numerosas condiciones de crecimiento también inducen el sistema Rcs: shock osmótico, shock ácido, contacto con superficie sólida, desecación, tratamiento con péptidos catiónicos antimicrobianos y β -lactámicos (121–124). Ya sea por mutaciones o condiciones fisiológicas, las condiciones activadoras identificadas pueden ser vinculadas con perturbaciones en la envoltura celular, sugiriendo que este sistema podría acoplar señales ambientales con el remodelamiento de la superficie celular (114). En nuestro laboratorio, se

reportó que mutaciones en la vía que codifica para las enzimas implicadas en la síntesis del ECA (del inglés *enterobacterial common antigen*) son señales inductoras del sistema Rcs en *S. marcescens* (38).

El sistema Rcs regula predominantemente genes involucrados en la producción de importantes estructuras asociadas a la superficie celular (flagelo, LPS, fimbrias), exopolisacáridos capsulares y proteínas involucradas en el mantenimiento y/o modificación de la superficie celular (114). Además de la síntesis de ácido colánico en *E. coli*, el sistema Rcs regula también la producción de cápsula en *Salmonella* y *Erwinia amylovoran*. En *Salmonella* regula la expresión del gen *ugd*, el cual es requerido para la modificación del lípido A del LPS, necesaria para promover resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos (125). El sistema Rcs es un regulador clave de la motilidad y se demostró que en *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella enterica* reprime la transcripción del operón *flhDC* que codifica para el regulador maestro del flagelo, bloqueando la biosíntesis flagelar (126–128). En nuestro laboratorio se determinó que, en *S. marcescens*, el sistema Rcs regula la motilidad y la secreción de fosfolipasa PhIA, ya que en su estado activo reprime transcripcionalmente la expresión del regulón flagelar (38). También se demostró que RcsB regula de forma negativa y directa la expresión del operón *shlBA* y, por lo tanto, la actividad hemolítica (21) y que está implicado en la regulación de la producción de OMVs (del inglés *outer-membrane vesicles*) (129).

I.4. Hemolisina

I.4.1. Sistemas de secreción de dos compañeros

La hemolisina fue el primer miembro caracterizado de un nuevo grupo de proteínas secretadas por el sistema de secreción de dos compañeros (130). Muchos patógenos gram-negativos utilizan estos sistemas para secretar exoproteínas de alto peso molecular que cumplen funciones en virulencia. Estos sistemas también se denominan TPS (del inglés *two-partner secretion system*) o sistemas de secreción tipo Vb y están compuestos por dos proteínas: las proteínas transportadas se llaman colectivamente TpsA y las proteínas transportadoras se ubican en la membrana externa y son denominadas TpsB. Las TpsAs tienen pesos moleculares que varían entre 100 y 500 kDa; en cambio, las proteínas TpsBs tienen un peso molecular cercano a 60 kDa. Generalmente los genes que las codifican están organizados en un operón. Ambas proteínas son sintetizadas como precursores que tienen una secuencia señal en el extremo N-terminal. Éstas son transportadas a través de la membrana plasmática de un modo dependiente del sistema Sec y la secuencia señal es clivada por una peptidasa. Luego, la TpsB se inserta en la membrana externa y el dominio de secreción dirige a la exoproteína hacia su transportador. Las exoproteínas atraviesan el periplasma en una conformación extendida y se pliegan progresivamente en la superficie celular antes de ser liberadas al medio extracelular (131). Algunas TpsAs son liberadas al medio y otras permanecen unidas de forma no covalente a la superficie celular (132).

Si bien estos sistemas fueron estudiados por primera vez en patógenos, se descubrió que están presentes en muchos grupos de bacterias gram-negativas. Las primeras funciones de TpsAs que se caracterizaron incluyen adherencia, citólisis, inmunomodulación, unión a grupos hemo e inhibición dependiente de contacto, entre otras. No obstante, puede que estas proteínas participen en otros procesos que no estén relacionados con virulencia (132).

I.4.2. Generalidades ShIA

El operón *shIBA* es un fragmento de 7,3 kpb que codifica para dos proteínas: ShIB y ShIA. El producto del gen *shIB* es una proteína de membrana externa de peso molecular 62 kDa necesaria para activar y transportar al medio extracelular a ShIA. ShIA es la hemolisina, una proteína de peso molecular 165 kDa que interacciona con la membrana de eritrocitos y, mediante la formación de poros, causa su lisis (133). Ambos péptidos son sintetizados como precursores que contienen secuencias señal N-terminal para su exporte mediado por el sistema Sec. Posteriormente, ShIB se integra en la membrana externa, donde forma un barril β . ShIA es translocada a través de la membrana externa de la bacteria por la acción de ShIB, que además la activa mediante un cambio conformacional (Figura I.4). Gracias a dicho cambio, ShIA es capaz de unirse a la membrana de eritrocitos y luego insertarse en ella, formando un poro. Según las observaciones de Hertle y colaboradores, la hemolisina permanece unida a la membrana externa bacteriana mediante uniones no covalentes con fosfatidiletanolamina. Esta forma es estable; en contraste, cuando ShIA es secretada al medio extracelular, presenta una vida media muy corta (134, 135). La fosfatidiletanolamina es el fosfolípido más abundante en la membrana externa y se reportó que es necesario para la activación de ShIA. Se postula que ShIB impone un cambio conformacional en ShIA que hace que la fosfatidiletanolamina permita la interacción entre la hemolisina y la bicapa lipídica de la membrana eucariota (134).

I.4.3. Generalidades ShIB

La proteína ShIB forma canales en la membrana externa de la bacteria que se abren por períodos de tiempo muy cortos, fluctuando rápidamente entre una conformación abierta y otra cerrada para permitir la translocación de ShIA (136). Según predicciones bioinformáticas, la estructura de ShIB se compone de una α -hélice N-terminal, seguida de dos dominios POTRA (del inglés *polypeptide-transport-associated domain*), denominados P1 y P2, y de un barril β compuesto por 16 hojas β plegadas (Figura I.4). La α -hélice N-terminal probablemente se inserte en el poro del barril β para mantenerlo cerrado, y así disminuir el flujo de sustancias tóxicas a través de la membrana externa (136, 137). Los dominios POTRA se encuentran en la mayoría de las proteínas TpsBs asociados a barriles β y, si bien se postula que podrían estar involucrados en el reconocimiento y secreción de la TpsA correspondiente, su rol aún no fue completamente dilucidado (132, 138).

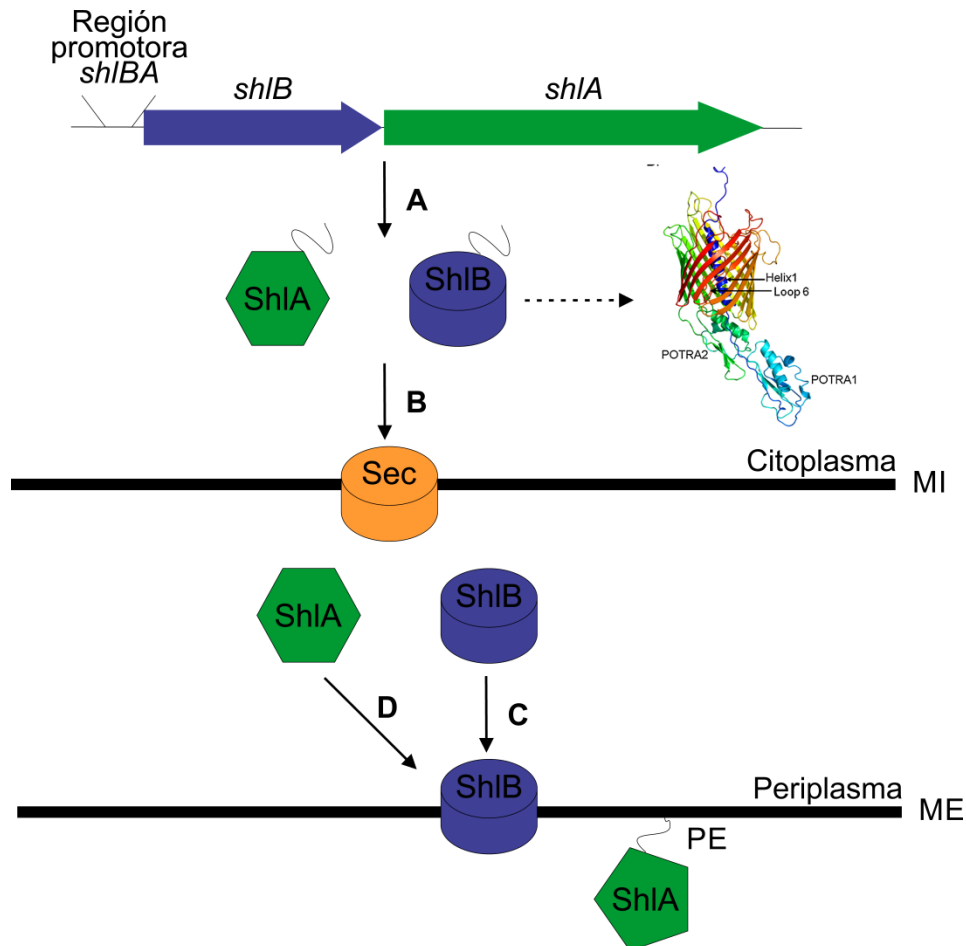


Figura I.4. Modelo de secreción de ShIA. A) La hemolisina es codificada por el operón *shIBA*. *shIA* codifica para la hemolisina y *shIB* para la proteína transportadora. En la parte derecha de la figura se puede observar la estructura de ShIB (137). Ambas proteínas son sintetizadas con una secuencia señal N-terminal y **B)** transportadas a periplasma por el sistema Sec. En el periplasma, la secuencia señal es clivada por la acción de una proteasa. **C)** ShIB se inserta en la membrana externa y **D)** permite la secreción y activación de ShIA mediante un cambio conformacional. ShIA queda anclada a la membrana externa por interacciones con fosfatidiletanolamina. MI: membrana interna. ME: membrana externa. PE: fosfatidiletanolamina.

I.4.4. Regulación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica es regulada por varios mecanismos. Dicha actividad no es dependiente de la concentración de Ca^{2+} , a diferencia de lo que ocurre en otras hemolisinas. Se observó que la actividad hemolítica de cultivos crecidos a 30°C es mayor que si hubiesen crecido a 37°C (139). La reducción de la actividad hemolítica a 37°C podría sugerir que la hemolisina no es un factor de virulencia importante en hospedadores de sangre caliente. Sin embargo, la eliminación de *shIBA* anula la virulencia en un modelo de ratón y la citotoxicidad contra múltiples líneas celulares de mamíferos (18, 140). Por lo tanto, a pesar que se expresa a bajos niveles a 37°C, la hemolisina todavía podría ser un potencial factor de virulencia a esta temperatura. Lin y colaboradores mostraron que este efecto de la temperatura se debe, al menos parcialmente, a la vía RssAB-FlhDC-ShIBA. La expresión de *shIBA* es regulada de manera positiva por el regulador maestro FlhDC. A su vez, *flhDC* es regulado negativamente por RssAB, un TCS que muestra una mayor expresión a altas temperaturas (141).

Asimismo, se reportó que la capacidad de lisar eritrocitos se ve incrementada en condiciones limitantes de hierro (142, 143). El hierro es un nutriente esencial cuya

disponibilidad en el hospedador está restringida por la acción de las proteínas que lo unen como transferrina y lactoferrina. La capacidad de establecer una infección depende, al menos en parte, de la capacidad de adquirir hierro y, por lo tanto, está aumentada por la producción de sideróforos y receptores proteicos anclados a membranas. Al producirse la lisis de los eritrocitos, se libera hemoglobina, que puede ser utilizada como fuente de hierro por muchas bacterias. Se postula que ésa podría ser la razón por la cual la actividad hemolítica de *S. marcescens* es mayor en condiciones limitantes de hierro (143, 144). Sin embargo, no hay indicios experimentales que indiquen que la lisis de eritrocitos tenga lugar durante la infección de *Serratia* en humanos.

Trabajos de nuestro laboratorio permitieron reportar que la expresión de *shIBA* es activada por la cascada regulatoria flagelar (FlhD₂C₂/FlhA) y reprimida por RcsB, el regulador de respuesta del sistema Rcs (21). Además, en su período post-doctoral, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que la expresión de *shIBA* se encuentra inducida a tiempos tardíos luego de la invasión a la línea de células epiteliales CHO (145).

I.4.5. Rol de ShIA en la patogénesis de *S. marcescens*

La hemolisina contribuye en gran medida a la patogénesis de *S. marcescens*, ya que aumenta la permeabilidad vascular, la formación de edemas y la acumulación de granulocitos mediante la liberación de mediadores de inflamación como leucotrienos e histamina (146). ShIA no sólo forma poros en membranas de eritrocitos, sino que también lo hace en membranas de fibroblastos y células epiteliales, debiéndose a ello su efecto citotóxico. Es un factor de virulencia importante tanto en vertebrados como invertebrados. Marre y colaboradores mostraron que la hemolisina de *S. marcescens* contribuye a la colonización del epitelio del tracto urinario en un modelo experimental de rata (140). Además, Kurz y colaboradores identificaron a la hemolisina de *S. marcescens* como un factor de virulencia necesario para la invasión en *C. elegans*, *D. melanogaster* y ratones. En ese mismo trabajo se demostró que una cepa mutante en *shIBA* presenta menor citotoxicidad ante distintas líneas celulares (18).

Previamente se reportó que, en dosis sub-líticas, ShIA induce depleción de ATP y eflujo de K⁺, tanto en células epiteliales como en fibroblastos. La liberación de K⁺ a través de los poros formados por ShIA en la membrana plasmática, es una señal para que la ATPasa Na⁺/K⁺ transporte K⁺ hacia la célula, pero la liberación a través de los poros de ShIA es mayor que la importación. En un intento de restaurar los niveles intracelulares de K⁺ se consumen las reservas de ATP intracelular. Asimismo, en estas células, a concentraciones mayores que las sub-líticas, ShIA conduce a la vacuolización del citoplasma y a la lisis celular (23, 147). Como se comentó previamente, en nuestro laboratorio, se determinó que la hemolisina ShIA es responsable de inducir un proceso autofágico no canónico en células CHO desde el medio extracelular (20, 21) y durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que, luego de la invasión y la replicación en células no fagocíticas, *Serratia* lleva a

cabo un mecanismo de egreso dependiente de ShIA (145).

I.4.6. Otras toxinas formadoras de poros

ShIA es una PFT (del inglés *pore-forming toxin*) que no posee homología de secuencia o estructural con las toxinas CDC (del inglés *cholesterol-dependent cytolysins*) o RTX (del inglés *repeats-in-toxin*). Además, el mecanismo que utiliza para formar poros es diferente al que utilizan otras toxinas. En la Tabla I.1 se comparan las características generales de PFTs de distintas familias. Hemolisinas homólogas a ShIA se encuentran codificadas en los genomas de *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Haemophilus ducreyi*, *Edwardsiella tarda* y *Erwinia chrysanthemi* (23).

	α -toxina	Streptolisina-O	Hemolisina de <i>E. coli</i>	ShIA
Cantidad de aminoácidos	297	538	1024	1608
Dominio de unión a membranas	Probablemente compuesto, formado por N-terminal y C-terminal	C-terminal	Dominio de unión a Ca^{2+} implicado	Central
Dominio formador de poros	Central	Desconocido	Probablemente N-terminal	C-terminal
Tamaño de poro	Pequeño (6 – 10 Å)	Muy grande (25 - 30 nm)	10 – 30 Å	10 – 15 Å
Tipo de toxina		CDC	RTX	

Tabla I.1. Comparación entre PFTs de distintas familias. Adaptado de Hertle, 2000 y Ristow y Welch, 2015 (23, 148).

Generalmente, las consecuencias de la formación de poros no selectivos en membranas dependen de dónde se formen dichos poros y de su tamaño. El blanco de la mayoría de las PFTs es la membrana plasmática y el principal efecto ocasionado es el cambio en la composición iónica del citosol y la pérdida del potencial de membrana. En particular, la concentración intracelular de K^+ disminuye, mientras que se produce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (149). La respuesta más importante que se ocasiona a partir del desbalance iónico es la reparación de membranas dañadas. El daño ocasionado por los poros de las CDCs es rápidamente reparado (en la escala de minutos); en contraste, los poros más pequeños pueden tardar más tiempo (más de 6 h) en ser reparados. Las PFTs pueden ser endocitadas para su destrucción, probablemente mediante la vía autofágica (149, 150).

Un ejemplo muy estudiado de la familia de las CDCs es la Listeriolisina O (LLO), la PFT de *Listeria monocytogenes*. Además de permitir el escape de *Listeria* al citosol (como será explicado en la sección I.5.3), esta toxina hace que las membranas eucariotas sean más permeables a iones y macromoléculas, ya que no sólo permite un influjo de Ca^{2+} al citosol de la célula hospedadora sino que también permite que las fosfolipasas tipo C PlcA y PlcB accedan a sus sustratos intracelulares, causando la liberación de Ca^{2+} desde reservorios internos. Las oscilaciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} causadas por LLO son de larga duración. El

influjo de Ca^{2+} no requiere la acción de canales de Ca^{2+} endógenos y una de sus consecuencias es la activación canales de K^+ (151, 152).

El prototipo de la familia de las toxinas RTX es HlyA, la hemolisina de *E. coli*. Dependiendo de su concentración y de la duración de la exposición, HlyA puede provocar la muerte de la célula hospedadora por lisis, necrosis o apoptosis. Luego del contacto con la célula hospedadora, HlyA induce flujos de Ca^{2+} y K^+ y la liberación de metabolitos, como ATP (153).

I.5. Biología celular de patógenos intracelulares

Las bacterias patógenas han evolucionado como grupo de microorganismos dotados de herramientas específicas, capaces de perturbar diversos procesos biológicos en células eucariotas a fin de lograr su propio beneficio. Sin embargo, luego de ser captados por la célula hospedadora en un compartimento unido a membrana, los patógenos bacterianos se enfrentan a los desafíos impuestos por la respuesta de defensa innata intracelular. Uno de los mecanismos de eliminación más importantes depende de la vía endocítica. Además, la vía autofágica también es capaz de eliminar a las bacterias patógenas al mediar la fusión entre los lisosomas y las vacuolas que contienen a los patógenos, en un proceso denominado xenofagia. Por ende, el éxito de estas bacterias reside en las estrategias que utilizan para manipular estos procesos y en el ciclo de vida que realizan intracelularmente. Para establecer y mantener una infección satisfactoria, los patógenos desarrollaron una variedad de estrategias para invadir las células hospedadoras, evadir o resistir la respuesta inmune innata, dañar las células, multiplicarse en su interior y diseminarse.

I.5.1. Internalización

La fagocitosis en mamíferos es dirigida, principalmente, por fagocitos profesionales, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que participan en la eliminación de grandes partículas, como son los microorganismos. La internalización y subsecuente destrucción del patógeno son claves para inducir la respuesta inmune innata y promover la presentación de antígenos y el desarrollo de la inmunidad adaptativa (154). En contraposición, las células no fagocíticas, tales como epiteliales o endoteliales, normalmente no endocitan microorganismos y conforman barreras naturales en defensa del hospedador. Estas células son invadidas por patógenos intracelulares, principalmente, a través de dos mecanismos: invasión tipo cierre o mediada por receptor, donde el microorganismo se une fuertemente a la célula y un progresivo movimiento de la membrana plasmática completa la internalización la bacteria; e invasión tipo gatillo, que implica drásticos rearrreglos del citoesqueleto que conducen a la formación de extensiones de la membrana plasmática, las cuales encierran al patógeno en el interior celular (155, 156).

I.5.2. Sistema inmune del hospedador

Luego de que la bacteria ha ingresado a la célula eucariota, se encuentra generalmente encerrada en una vesícula membranosa y transita a través del sistema vacuolar celular. Durante el tráfico intracelular, el microorganismo está expuesto a los mecanismos de defensa del hospedador. Las bacterias patógenas despliegan estrategias específicas que les permiten evadir estos mecanismos y establecer un nicho adecuado para su supervivencia y replicación.

La vía endocítica constituye la ruta de ingreso de solutos, lípidos y proteínas a la célula y tiene un rol central en la interacción con los microorganismos. Esta vía está compuesta por diferentes organelas, conocidas como endosomas o fagosomas, que se comunican de manera unidireccional. Cada endosoma presenta una función característica y la maduración de los mismos es un proceso dinámico (157). Luego del ingreso de la bacteria, el fagosoma temprano presenta un lumen medianamente ácido (pH 6,1 - 6,5) y escasa actividad hidrolítica. Posteriormente, el fagosoma progresa a la etapa tardía, reclutando la bomba de protones vH^+ -ATPasa y, en consecuencia, presentando un lumen más ácido (pH 5,5 - 6). El proceso de maduración de esta vía culmina con la fusión de los fagosomas tardíos con los lisosomas para dar origen a los fagolisosomas. En este proceso, se reclutan más moléculas de vH^+ -ATPasa, con lo cual se acidifica más el lumen (pH cercano a 4,5). Asimismo, los fagolisosomas adquieren enzimas hidrolíticas, tales como catepsinas e hidrolasas (158). La actividad microbicida de los fagolisosomas, se debe a la activación de enzimas hidrolíticas a pH ácido, a la generación de especies reactivas de oxígeno, a la actividad de péptidos antimicrobianos y a la privación de nutrientes que sufre la bacteria en este compartimento (154).

Otra respuesta de defensa del hospedador es la vía autofágica. La autofagia es un proceso altamente conservado en eucariotas que involucra el secuestro de componentes citoplasmáticos y organelas dañadas en vesículas rodeadas de doble membrana llamadas autofagosomas que, finalmente, se fusionan con lisosomas. Ocurre a un nivel basal para mantener la homeostasis celular; sin embargo, ciertos tipos de estrés, incluyendo infecciones por patógenos, pueden resultar en una fuerte inducción. Se reportó que cumple un importante rol en la regulación de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa y la inflamación y en la detección y eliminación de patógenos intracelulares. Sin embargo, algunos patógenos utilizan estrategias para impedir su degradación en autolisosomas. Dichas estrategias pueden ser clasificadas en cuatro grupos según su objetivo: evitar la inducción de autofagia, impedir la maduración del autofagosoma a autolisosoma, evitar el reconocimiento del patógeno por la maquinaria autofágica y permitir el escape al exterior de autofagosomas. Por otro lado, algunas especies utilizan la vía autofágica para su beneficio, pudiendo sobrevivir y replicarse dentro de los autofagosomas (159–161).

La fusión de LC3 a la proteína verde fluorescente GFP es comúnmente utilizada como marcador de autofagia, ya que la inducción de dicho proceso genera una importante disminución de la fluorescencia verde en el citosol (forma LC3-I, citosólica) y, al mismo tiempo,

se produce un puntillado verde correspondiente a la forma LC3-II, reclutada en membranas de autofagosomas (162).

I.5.3. Mecanismos de egreso de patógenos

Los patógenos intracelulares presentan diferencias considerables en los mecanismos de internalización, establecimiento del nicho replicativo y replicación intracelular. Como consecuencia, cada patógeno reside en un ambiente particular que determina los requerimientos específicos para realizar un mecanismo de egreso exitoso. Sin embargo, hay estrategias de escape que son similares, incluso entre patógenos no relacionados. En primer lugar, la localización intracelular de la bacteria dentro de la célula hospedadora es un factor determinante para el egreso. En la mayoría de los casos, luego de la internalización el patógeno se encuentra en una vacuola y uno de los mayores desafíos que enfrentan las bacterias intracelulares es la progresiva acidificación del compartimento. Hay escasas excepciones, como *Coxiella* o *Leishmania*, que son inmunes a las condiciones drásticas y pueden replicar y sobrevivir en un ambiente hostil. Los patógenos que no poseen esa ventaja desarrollaron estrategias para impedir su eliminación, evadiendo la respuesta inmune de la célula hospedadora (163, 164). Algunos patógenos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, *Chlamydia*, *Salmonella* y *Legionella*, manipulan la maduración del fagosoma y establecen un nicho replicativo en la vacuola de la cual pueden escapar. Otros patógenos, como *L. monocytogenes* o *Shigella flexneri*, necesitan escapar de la vacuola que los contiene para replicar en el citosol previo a su diseminación (163).

Las estrategias de egreso pueden ser líticas o no líticas, dependiendo de si ocasionan daño a la célula hospedadora. Los mecanismos líticos tienen un impacto importante, ya que el daño tisular dispara la respuesta inflamatoria del hospedador, resultando en el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de la infección. Sin embargo, muchos patógenos utilizan estrategias líticas y se demostró que pueden subvertir y modular la respuesta inflamatoria (163). Varias estrategias de egreso han sido reportadas (Figura I.5) y se revisarán algunas de ellas a continuación.

Legionella pneumophila reside en una vacuola durante la replicación e induce la fusión de la misma con la membrana plasmática del hospedador para egresar y diseminarse. Según similitudes estructurales, las proteínas LepA y LepB podrían actuar como SNARE y dirigir al patógeno a la vía exocítica (165). *Porphyromonas gingivalis* también egresa por un mecanismo exocítico pero es dirigido al mismo por una vía de reciclado. Estos mecanismos son de tipo no lítico y no involucran un paso por el citosol de la célula hospedadora (166).

Chlamydia es una bacteria intracelular obligada que replica en un compartimento rodeado de membrana denominado inclusión. Puede escapar de la célula hospedadora por dos mecanismos excluyentes: extrusión o un mecanismo lítico, que incluye dos pasos bien definidos. El primer paso es la lisis de la inclusión ocasionada por una proteasa.

Posteriormente, se produce la ruptura de la membrana plasmática de la célula hospedadora, disparando un influjo de Ca^{2+} y la liberación de las bacterias citosólicas (167). En contraposición, la extrusión es un proceso no lítico en el cual las vacuolas son expulsadas de la célula por un mecanismo mediado por actina. Los cuerpos de inclusión extracelulares resultantes están rodeados por dos membranas derivadas del hospedador (168).

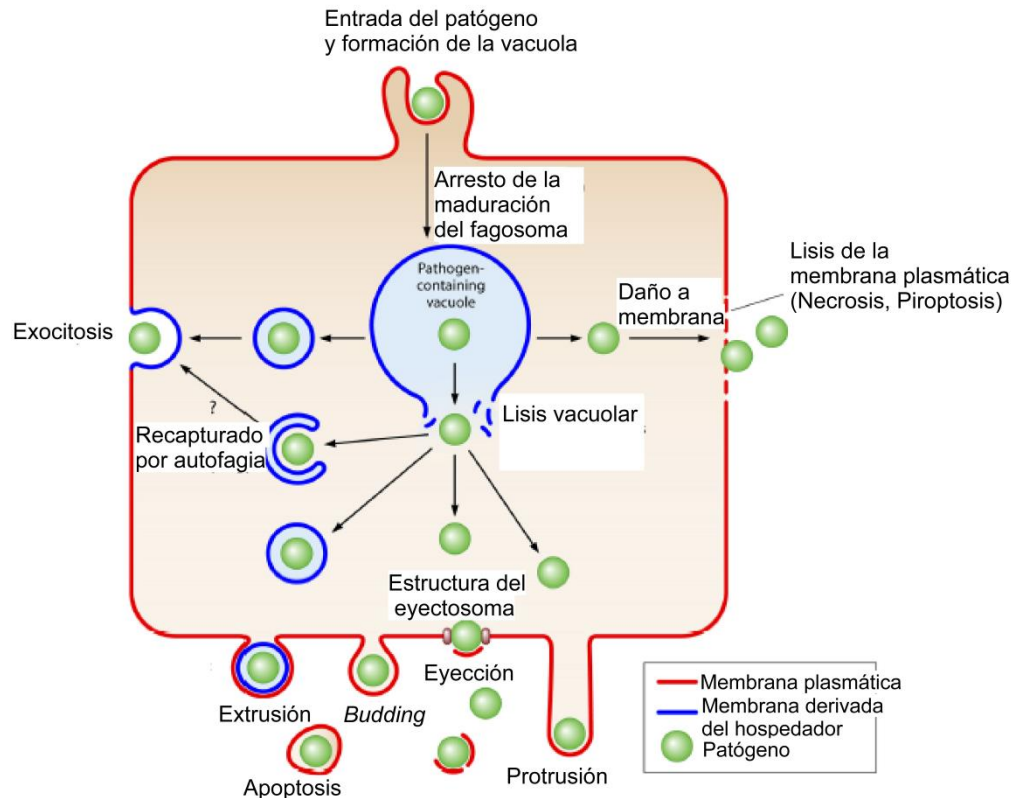


Figura I.5. Estrategias de egreso. Luego de la internalización, los patógenos se encuentran encerrados en una vacuola. Las bacterias pueden egresar de la célula hospedadora manteniendo la integridad de la vacuola (exocitosis o extrusión) u ocasionar la lisis de la vacuola y egresar desde el citosol. Una vez que se encuentran en el citosol, los patógenos pueden escapar de la célula de maneras no líticas (eyección o protrusión, por ejemplo) o líticas (necrosis o piroptosis). Adicionalmente, los patógenos citosólicos pueden ser capturados por la vía autofágica y egresar por un mecanismo de tipo exocítico. Adaptado de Friedrich y colaboradores, 2012 (163).

S. flexneri y *L. monocytogenes* egresan mediante un mecanismo similar. Una vez que el patógeno ha ingresado a la célula, rompe la membrana del fagosoma y escapa al citosol donde replica. En el caso de *S. flexneri*, la lisis de la membrana vacuolar es mediada por tres proteínas secretadas por el sistema de secreción de tipo 3: IpaB, IpaC e IpaD (169–171). *L. monocytogenes* expresa dos fosfolipasas C, PlcA y PlcB, que actúan junto a LLO y permiten la disrupción de la vacuola (152, 172). Una vez en el citosol, *S. flexneri* expresa la proteína IcsA y *Listeria* expresa la proteína ActA. Ambas proteínas reclutan la maquinaria de polimerización de actina, formando una cola que permite la propulsión de los patógenos y la diseminación a otras células (173, 174).

E. coli uropatogénica (UPEC) infecta células epiteliales de vejiga y evita su degradación neutralizando el pH lisosomal. Este cambio es indicador de lisosomas defectuosos y es detectado por un canal de calcio eucariota de la familia de los TRP. En respuesta, se produce un incremento en la concentración de calcio citosólico y, como consecuencia, se induce la

exocitosis lisosomal, expulsando las bacterias contenidas en exosomas. Se postula que el hecho de que las bacterias egresen rodeadas de membranas proveniente del hospedador reduciría la posibilidad de que UPEC se re-adhiera a las mismas células, eliminando las bacterias en orina (175).

II. OBJETIVOS

Como se refirió en la introducción general, en humanos, *S. marcescens* es un patógeno oportunista, aislándose como agente etiológico de un vasto espectro de infecciones, con creciente incidencia en ámbitos extra e intra-hospitalarios. Gracias a la expresión de factores de virulencia, *Serratia* posee la capacidad de adaptarse y colonizar diversos nichos tanto intra- como extra-hospedador. Si bien se predice un rol general en la patogénesis para todos estos factores, la relevancia de cada uno, sus mecanismos moleculares de acción y las vías regulatorias que gobiernan su expresión permanecen pobremente caracterizados.

En este contexto, como **Objetivo Principal** de este Trabajo de Tesis, se propone:

- Ampliar el conocimiento sobre los mecanismos esenciales para la interacción de *S. marcescens* con otras bacterias y con el hospedador en el proceso infeccioso, utilizando a *Serratia* como modelo de estudio de patógenos oportunistas.

Para tal fin, planteamos los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Identificar las señales y mecanismos regulatorios que modulan la expresión del SST6 de *S. marcescens*,
- Analizar el rol del SST6 en la patogénesis de *S. marcescens*,
- Caracterizar el mecanismo de egreso llevado a cabo por *Serratia* luego de la invasión en células no fagocíticas,
- Comprender la función y el mecanismo de acción de la hemolisina ShIA.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Cepas bacterianas, líneas celulares, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas y líneas celulares utilizadas en esta Tesis se describen en las Tabla III.1 y Tabla III.2, respectivamente. Los plásmidos y los oligonucleótidos se detallan en la Tabla III.3 y Tabla III.4.

Cepa bacteriana	Genotipo y comentarios	Referencia
<i>Serratia marcescens (Sma)</i>		
RM66262	Salvaje (wt); aislamiento clínico	(176)
<i>tssM</i>	RM66262 <i>tssM</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(177)
<i>pppA</i>	RM66262 <i>pppA</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(177)
<i>flhD</i>	RM66262 <i>flhD</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(20)
<i>fliA</i>	RM66262 <i>fliA</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(21)
<i>cpxR</i>	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(177)
<i>phoP</i>	RM66262 <i>phoP</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(22)
<i>rcsB</i>	RM66262 <i>rcsB</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(38)
<i>rcsB/pBB::rcsB</i>	RM66262 <i>rcsB</i> ::pKNOCK-Gm ^R /pBBR1MCS:: <i>lacI</i> :: <i>rcsB</i> ; Cm ^R	(21)
<i>rscC</i>	RM66262 <i>rscC</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(38)
<i>rscF</i>	RM66262 <i>rscF</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(38)
<i>wecG</i>	RM66262 <i>wecG</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(38)
<i>shIBA</i>	RM66262 <i>shIBA</i> ::Km ^R	(145)
<i>shIB</i>	RM66262 <i>shIB</i> ::pKNOCK-Sp ^R	(145)
<i>shIB/pshIB</i>	RM66262 <i>shIB</i> ::pKNOCK-Sp ^R /pBBR1MCS:: <i>shIB</i> ; Cm ^R	(145)
<i>wt/pgfp</i>	RM66262/pBBR1MCS:: <i>gfpmut3.1</i> ; Cm ^R	(22)
<i>shIBA/pgfp</i>	RM66262 <i>shIBA</i> ::Km ^R /pBBR1MCS:: <i>gfpmut3.1</i> ; Cm ^R	(145)
<i>wt/pcherry</i>	RM66262/pBBR1MCS:: <i>mcherry</i> ; Cm ^R	(145)
<i>shIBA/pcherry</i>	RM66262 <i>shIBA</i> ::Km ^R /pBBR1MCS:: <i>mcherry</i> ; Cm ^R	(145)
<i>wt/ppromSST6</i>	RM66262 <i>wt/ppromSST6</i> ; Km ^R	Este trabajo
<i>tssM/ppromSST6</i>	RM66262 <i>tssM</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>flhD/ppromSST6</i>	RM66262 <i>flhD</i> ::pKNOCK-Cm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>fliA/ppromSST6</i>	RM66262 <i>fliA</i> ::pKNOCK-Cm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>cpxR/ppromSST6</i>	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>phoP/ppromSST6</i>	RM66262 <i>phoP</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>rscB/ppromSST6</i>	RM66262 <i>rscB</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>rscC/ppromSST6</i>	RM66262 <i>rscC</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>rscF/ppromSST6</i>	RM66262 <i>rscF</i> ::pKNOCK-Gm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>wecG/ppromSST6</i>	RM66262 <i>wecG</i> ::pKNOCK-Cm ^R /ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
<i>wt/ppromshIBA-gfp</i>	RM66262/pprom <i>shIBA-gfp</i> ; Sp ^R	(21)
Db10	Salvaje (wt); aislamiento entomopatogénico	(178)
Db10 <i>tssM</i>	Db10 <i>tssM</i> ::pKNG101-Sm ^R	Este trabajo

Db10/ppromSST6	Db10 wt/ppromSST6; Km ^R	Este trabajo
Db10/pBB1	Db10 wt/pBBR1MCS; Cm ^R	Este trabajo
Db10/pBB2	Db10 wt/pBBR1MCS-2; Km ^R	Este trabajo
Db10 <i>tssM</i> /pBB1	Db10 <i>tssM</i> ::pKNG101-Sm ^R /pBBR1MCS; Cm ^R	Este trabajo
Db10 <i>tssM</i> /pBB2	Db10 <i>tssM</i> ::pKNG101-Sm ^R /pBBR1MCS; Km ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
MC4100	Cepa modelo de laboratorio; Sm ^R	(179)
DH5α	Cepa modelo de laboratorio	Stock del laboratorio
W3110/pshIA	W3110/pT7-5:: <i>shIA</i> ; Amp ^R	(21)
W3110/pshIBA	W3110/pT7-5:: <i>shIBA</i> ; Amp ^R	(21)
BL21/ pHisParallel:: <i>rcsB-6xHis</i>	BL21 (DE3) pLysS/pHisParallel:: <i>rcsB-6xHis</i> ; Amp ^R	(21)
BL21/pET:: <i>hcp-6xHis</i>	BL21 (DE3) pLysS/pET28a:: <i>hcp-6xHis</i> ; Km ^R	Este trabajo
SM10/pKNG101:: <i>fragtssM</i>	SM10 λ pir/pKNG101:: <i>fragtssM</i> ; Sm ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
ATCC13048	Salvaje	Stock del laboratorio
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
14028S	Salvaje	Stock del laboratorio
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		
M2	Salvaje (wt)	(180)
<i>tssB</i>	M2 Δ <i>tssB</i>	(181)
<i>tssD</i>	M2 Δ <i>tssD</i>	(181)
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
ATCC17978	Salvaje (wt); T6+	(182)
<i>tssM</i>	ATCC17978 Δ <i>tssM</i>	(182)
<i>vgrG1</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG1</i>	(183)
<i>vgrG2</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG2</i>	(183)
<i>vgrG3</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG3</i>	(183)
<i>vgrG4</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG4</i>	(183)
<i>vgrG2,3</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG2,3</i>	(183)
<i>vgrG2,4</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG2,4</i>	(183)
<i>vgrG3,4</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG3,4</i>	(183)
<i>vgrG2,3,4</i>	ATCC17978 Δ <i>vgrG2,3,4</i>	(183)
<i>tse3</i>	ATCC17978 Δ <i>tse3</i>	(183)
1225 SST6+		Stock Laboratorio Mario Feldman

1225 SST6-		Stock Laboratorio Mario Feldman
AbCA1 p-	AbCA1	Stock Laboratorio Mario Feldman
AbCA1 p+	AbCA1/p	Stock Laboratorio Mario Feldman
<i>Acinetobacter baylyi</i>		
ADP1	Salvaje (wt)	(184)
<i>tssM</i>	ADP1 Δ <i>tssM</i>	(184)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Silvestre (wt)	(185)
<i>icmF1</i>	PAO1 Δ <i>icmF1</i>	(185)
<i>retS</i>	PAO1 Δ <i>retS</i>	(185)
<i>retS icmF1</i>	PAO1 Δ <i>retS</i> Δ <i>icmF1</i>	(185)
<i>Vibrio cholerae</i>		
V52	Salvaje (wt); Δ <i>rtxA</i> Δ <i>hlyA</i> Δ <i>hapA</i>	(83)
<i>tssM</i>	Salvaje (wt); Δ <i>rtxA</i> Δ <i>hlyA</i> Δ <i>hapA</i> Δ <i>vasK</i>	(83)

Tabla III.1. Cepas bacterianas y líneas celulares.

Línea celular	Características relevantes	Referencia
CHO	Células epiteliales provenientes de ovario de hámster chino	(186)
CHO-EGFP-LC3	Células CHO transfectadas establemente con pEGFP:: <i>lc3</i>	(186)

Tabla III.2. Líneas celulares.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pBBR1MCS (pBB1)	Vector de clonado de amplio rango de hospedador, movilizable y de mediano número de copias, Cm ^R	(187)
pBBR1MCS-2 (pBB2)	Vector de clonado de amplio rango de hospedador, movilizable y de mediano número de copias, Km ^R	(187)
pPROBE(NT')::promSST6 (ppromSST6)	Región promotora putativa del <i>cluster</i> génico del SST6, clonada en pPROBE-NT', Km ^R	Este trabajo
pBBR1MCS:: <i>lacI</i> :: <i>rcsB</i> (<i>prcsB</i>)	Gen <i>rcsB</i> completo, clonado en pBBR1-MCS:: <i>lacI</i> , Cm ^R	(21)
pBBR1MCS:: <i>shIB</i> (<i>pshIB</i>)	Gen <i>shIB</i> completo, clonado en pBBR1-MCS, Cm ^R	(145)
pT7-5:: <i>shIA</i> (<i>pshIA</i>)	Gen <i>shIA</i> completo, clonado en pT7-5, Amp ^R	(133)
pT7-5:: <i>shIBA</i> (<i>pshIBA</i>)	Operón <i>shIBA</i> completo, clonado en pT7-5, Amp ^R	(133)
pBBR1MCS:: <i>gfpmut3.1</i> (<i>pgfp</i>)	Gen <i>gfp</i> completo, clonado en pBBR1MCS, Cm ^R	(22)
pBBR1MCS:: <i>mcherry</i> (<i>pcherry</i>)	Gen <i>mcherry</i> completo, clonado en pBBR1MCS, Cm ^R	(145)

pET28a:: <i>hcp-6xHis</i>	Gen <i>hcp</i> completo, clonado en pET28a con fusión a 6xHis, Km ^R	Este trabajo
pKNG101:: <i>fragtssM</i>	Frgamento de 400 pb interno de <i>tssM</i> clonado en pKNG101, Sm ^R	Este trabajo
YFP-gal-8	Vector de expresión en células eucariotas, fusión de Gal8 a YFP.	(188)

Tabla III.3. Plásmidos.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
vgrGRTFw	ATGGATCGCCTTATCATTG
vgrGRTRv	CGCCTGCTTCCCGTCCGGAG
hcpRTFw	ATGGCTATCGATATGTTCC
hcpRTRv	ACTCAACCTTGGTCAGGTG
16S Fw	AAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
16S Rv	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG
promSST6Fw	TCGGATCCGCTGCATTTTCAACCGTTCCG
promSST6Rv	CGGAATTCACTATTCCCGCTTTAGGC
hcpFw	AAAGAGTGAAGAACATATGGCTATC
hcpRv	TACAAAGAATTCTTAAGCTTCGC
TipoVI1295Fw	TGCTCTAGAAGCCGTCAATATCTGTACC
TipoVI1295Rv	GACCTCGAGGTTCAATCAGGCGTTTGC
PromShIBFwEcoRI	CGGAATTCTATTTCTCGCCGCTGG
PromShIBRvBamHI	CGGGATCCGTGCTGACCAACAGC

Tabla III.4. Oligonucleótidos (Cebadores).

III.2. Medios de cultivo

Las bacterias fueron cultivadas en el medio de cultivo comercial Luria-Bertani (LB, Difco): peptona de carne 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l. Las cepas bacterianas se cultivaron a 30°C o 37°C, con o sin agitación, según se indica en cada caso. Para la preparación de medios sólidos, se agregó agar en una concentración final de 15 g/l. Los antibióticos empleados para los cultivos bacterianos fueron: ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), tetracilina (15 µg /ml), estreptomina (100 µg/ml) y gentamicina (15 µg/ml).

Las células epiteliales CHO (del inglés *Chinese hamster ovary*) y CHO-EGFP-LC3 fueron cultivadas en medio α-MEM (Invitrogen). Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (Internegocios). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

III.3. Técnicas moleculares de ácidos nucleicos

III.3.1. Preparación de ADN cromosomal

El ADN cromosomal se preparó a partir de células de *S. marcescens*. Se centrifugaron 3 ml de un cultivo saturado de células crecidas en medio LB a 37°C con agitación constante. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 2,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM; NaCl 150 mM y luego se repitió la centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 2,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM. Luego se agregaron 275 µl de lisozima 2 mg/ml (Sigma), y se incubó 20 min a 37°C. Se agregaron 300 µl de una solución de Sarkosyl 10% (p/v) (Sigma) y 30 µl de una solución de proteinasa K 1 mg/ml (Invitrogen), y se incubó a 55°C durante 1 h. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol equilibrado con Tris-HCl 100 mM pH 8,0 (para la primera y segunda extracción); y con cloroformo:fenol en proporción 1:1 (v/v) (para la tercera extracción), conservando siempre la fase acuosa. Se centrifugó la mezcla a 10000 g durante 5 min, se recuperó la fase acuosa que contiene al ADN cromosomal y se le agregaron 1/10 partes en volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 15000 g durante 20 min. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol 80% (v/v) (Merck), se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 300 µl de H₂O milli-Q. La concentración de ADN fue determinada midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm, según la siguiente fórmula:

$$1 \text{ unidad de Abs}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg de ADN/ml de solución}$$

La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$. Un valor entre 1,7 y 2,0 indica que se halla libre de proteínas y fenol (189). También se analizó el ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, como se indica en la sección III.3.7.

III.3.2. Preparación de ADN bacteriano plasmídico

La extracción de plásmidos a partir de células de *E. coli*, previamente transformadas, se realizó creciendo las bacterias durante toda la noche a 37°C, con agitación constante en 3 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El cultivo se centrifugó y las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 350 µl de solución STET: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; sacarosa 8% (p/v); Tritón X-100 5% (v/v) (Sigma). Luego se adicionaron 10 µl de una solución conteniendo: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; lisozima 10 mg/ml; ARNasa 1 mg/ml (Sigma); y glicerol 50% (v/v). La mezcla se incubó 1 min a 100°C y, posteriormente, se centrifugó 10 min a 15000 g. Con un palillo estéril se removió el pellet y se conservó el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico. Se realizó una extracción con 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo en relación 1:1 (v/v) y se recuperó la fase acuosa. El ADN se precipitó agregando 1/10 partes en volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol. Se incubó la mezcla a -20°C durante 30 min y se centrifugó por 10 min a 15000 g. El ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol 80% (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente,

el precipitado se resuspendió en 20 μl de H_2O milli-Q y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Alternativamente, para obtener ADN plasmídico de mejor calidad, se utilizó el kit comercial GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.3. Extracción de ARN total a partir de cultivos bacterianos de *S. marcescens*

Para la extracción de ARN total se realizó una dilución 1/100 de cultivos saturados de la cepa de interés en 25 ml de medio LB a 37°C con agitación. Una vez alcanzada la $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$ se adicionaron 5 ml de una solución fría de etanol absoluto 95%/fenol pH 5,5 5% y se incubó en hielo durante 20 min. Luego las células fueron cosechadas por centrifugación, resuspendidas en *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM pH 7; EDTA 1 mM) y nuevamente centrifugadas. Los siguientes pasos de extracción se realizaron usando un kit comercial (Promega SV Total RNA Isolation kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm de una alícuota, según la fórmula:

$$1 \text{ unidad de Abs}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g de ARN/ml de solución}$$

Todas las preparaciones de ARN que fueron utilizadas en los ensayos de qRT-PCR presentaron un valor del cociente ($\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$) entre 1,7 y 2,0, lo que indica que se hallaban esencialmente libres de proteínas y fenol (189). Además se analizó el ARN total obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v), como se indica en la sección III.3.7.

III.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos por PCR se siguió un protocolo básico consistente en la desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 4 min, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C , anillado de los cebadores entre 50 y 60°C (dependiendo de las características de los oligonucleótidos) y elongación del ADN a 72°C o 68°C (según la ADN polimerasa utilizada), para cada ciclo. Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 s cada uno, y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (se calculó 1 min por kpb). Finalmente, se incluyó una etapa de extensión a 72°C o 68°C durante 5 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient. El volumen final de las reacciones fue de 50 μl , conteniendo solución 1X de amplificación comercial suplementada con: MgCl_2 2,5 mM; desoxinucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP 0,25 mM de cada uno (GenBiotech); ADN genómico 500 ng; oligonucleótidos directo y reverso 10 pmoles cada uno; y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) o de *Pfx50* ADN polimerasa (Invitrogen). Los oligonucleótidos se describen en la Tabla III.4. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en la sección III.3.7.

III.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)

La reacción de amplificación de ADN se realizó a partir de una colonia bacteriana inoculada directamente en un volumen final de 20 μ l, conteniendo solución 1X de amplificación comercial suplementada con: $MgCl_2$ 2,5 mM; desoxinucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP 0,25 mM de cada uno; oligonucleótidos directo y reverso 10 pmoles cada uno; y Taq ADN polimerasa 1 U. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Esta técnica se utilizó para la búsqueda de la presencia de distintos fragmentos de interés en las cepas de *E. coli* transformadas. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla III.4. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa como se indica en la sección III.3.7.

III.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

La síntesis de ADN copia se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios; ARN total 2 μ g; y retrotranscriptasa Superscript II™ 1 U (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN copia fueron diluidas 1/10 en H_2O milli-Q. 5 μ l de cada una de estas diluciones se utilizaron como molde para las reacciones de qPCR, usando los pares de cebadores: vgrGRT Fw-Rv y hcpRT Fw-Rv; según se indique. Se incluyó el gen 16S como gen normalizador (combinando los cebadores 16S Fw y 16S Rv). En todos los casos, el fragmento amplificado fue de alrededor de aproximadamente 250 pb. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en presencia del colorante SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) y se monitorearon en tiempo real con el termociclador Mastercycler Realplex RT-PCR (Eppendorf).

Para todas las qPCRs, la expresión relativa se calculó utilizando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para cada transcritpo de la siguiente manera: expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$; siendo ΔCt = Ct transcritpo de interés – Ct gen normalizador; y $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt condición experimental – ΔCt condición de referencia.

III.3.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN genómico y plasmídico, los fragmentos de restricción enzimática y productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración. Se utilizó el sistema de tipo submarino (189). La solución reguladora TBE 0,5 X (Tris base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM) se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. A estos últimos se les agregó el agente intercalante bromuro de etidio en una concentración de 0,3 μ g/ml antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por: azul de bromofenol 0,025% (p/v); xilencianol 0,025% (p/v); y glicerol 30% (v/v), en una proporción 5:1 en volumen de muestra: solución de siembra. Como marcador de peso molecular se utilizó 1Kb DNA Ladder (GenBiotech). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 180 V y, una vez finalizada, los fragmentos de ADN se detectaron empleando el sistema de captura de imágenes

ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad), utilizando el modo de iluminación *Trans-UV*.

III.3.8. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o luego de la digestión con enzimas de restricción fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante la tecnología de adsorción en columna provista por el kit comercial GFX (GE Life Sciences), siguiendo las indicaciones del fabricante. Alternativamente, se utilizó el mismo kit comercial para purificar fragmentos de ADN directamente a partir de mezclas de reacción de PCR.

III.3.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las condiciones de digestión usadas en cada caso fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. Los volúmenes de reacción variaron entre 20 y 30 μ l, utilizándose aproximadamente 1 U de enzima por μ g de ADN a digerir. El tiempo de incubación a las temperaturas recomendadas fue de 3 h en la mayoría de los casos, pudiendo ser mayor según la enzima utilizada. El tamaño de los fragmentos de ADN digeridos con las enzimas de restricción se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa, como se describe en la sección III.3.7.

III.3.10. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l conteniendo: enzima T4 ADN ligasa 2 U (Thermo Fisher Scientific); solución de reacción comercial 1X; y los fragmentos de ADN a ligar en proporciones molares 1:3, 1:1 o 3:1 de vector:inserto. Las reacciones se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 18°C.

III.3.11. Construcción del plásmidos reporteros y de expresión

Con el objetivo de construir el vector reportero pPROBE(NT')::promSST6 (ppromSST6) se amplificó por PCR la región promotora putativa del *cluster* que codifica para los componentes estructurales del SST6 de *S. marcescens* RM66262 utilizando los cebadores promSST6Fw y promSST6Rv. El producto obtenido fue purificado y se realizó una restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. Se ligó el fragmento al vector pPROBE(NT'), digerido previamente con EcoRI y BamHI. El plásmido resultante se introdujo a la cepa *E. coli* One Shot® TOP10 por transformación química. Finalmente, el plásmido pPROBE(NT')::promSST6 se movilizó por conjugación a las cepas indicadas de *S. marcescens* RM66262.

Para obtener la proteína de fusión Hcp-6xHis, en primera instancia se amplificó el gen *hcp* por PCR a partir del ADN cromosomal de *S. marcescens* RM66262, utilizando los cebadores hcpFw y hcpRv. Luego, el fragmento obtenido se clonó entre los sitios NdeI y EcoRI del vector de expresión pET28a, obteniendo el plásmido pET28a::hcp-6xHis. Éste finalmente se introdujo por transformación química en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

III.3.12. Servicios de secuenciación de ADN

Los fragmentos de ADN clonados en plásmidos fueron secuenciados a través del servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, USA (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/services.html>).

III.4. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E. coli*, se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria y se incubó con agitación permanente a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de entre 0,5 y 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 6000 *g* a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó con una solución fría de $CaCl_2$ 0,1 M. Posteriormente, se volvieron a resuspender las células en $CaCl_2$ 0,1 M y se incubaron en hielo durante 20 min, periodo tras el cual se centrifugaron las células a 6000 *g* a 4°C durante 5 min. Finalmente, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 3 ml de glicerol 50% (v/v) y 7 ml $CaCl_2$ 0,1 M, y se fraccionó en tubos estériles que se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

III.5. Transformación de células competentes y selección de transformantes

Para la transformación de células de *E. coli*, se agregaron 10 μ l de mezcla de ligación, o 1 μ l de plásmido, a 100 μ l de la suspensión de células competentes preparadas como se indicó en la sección anterior y se incubó en hielo durante 20 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico consistente en introducir el tubo durante 2 min en un termobloque a 42°C. Tras la transformación, las células se recuperaron añadiendo 1 ml de medio LB fresco sin antibiótico e incubándolas durante 1 h a 37°C con agitación. Finalmente, las células se sembraron en placas de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformantes y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

III.6. Conjugación bipartita

Se cultivaron las cepas dadoras de *E. coli* SM10 λ pir (transformadas previamente con el plásmido a conjugar) y las cepasceptoras de *S. marcescens* en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, con un palillo estéril, se tomaron varias colonias de la cepa dadora y se mezclaron con colonias de la cepa aceptora en una placa de LB-agar. Dicha placa se incubó a 37°C durante 18 h. Finalmente, las bacterias transconjugantes se seleccionaron repicando colonias de la placa anterior en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente al plásmido conjugado, y con un antibiótico resistente para la cepa aceptora: para *S. marcescens* RM66262 se usó ampicilina 100 μ g/ml; para *S. marcescens* Db10 se utilizó tetraciclina 12,5 μ g/ml. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

III.7. Conjugación tripartita

Se cultivaron la cepa dadora (*E. coli* transformada con el plásmido a conjugar), la cepa

aceptora (*S. marcescens*) y una cepa que contiene un plásmido auxiliar (*helper*, *E. coli* HB101/pRK2013) en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C. Con un palillo estéril, se tomaron varias colonias de la cepa dadora y la cepa auxiliar y se mezclaron con colonias de la cepa aceptora en una placa de LB-agar. Dicha placa se incubó a 37° durante 18 h. Finalmente, las bacterias transconjugantes se seleccionaron repicando colonias de la placa anterior en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente al plásmido a conjugar y con un antibiótico para el cual la cepa aceptora sea resistente, como se detalló en la sección anterior. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

III.8. Manipulación genética

III.8.1. Construcción de la cepa mutante *tssM* en *S. marcescens* Db10 por inserción del vector suicida pKNG101

La cepa mutante *tssM* de *S. marcescens* Db10 se originó a partir de un simple evento de recombinación en el cual el vector pKNG101 interrumpió la secuencia codificante de *tssM*. El primer paso consistió en la amplificación por PCR un fragmento de 400 pb interno utilizando los cebadores TipoVI1295Fw y TipoVI1295Rv. El producto obtenido fue purificado y se realizó una restricción con las enzimas XbaI y XhoI. Se ligó el fragmento al vector pKNG101, digerido previamente con XbaI y XhoI. El plásmido resultante se introdujo a la cepa *E. coli* SM10 λ pir por transformación química. Finalmente, el plásmido pKNG101::frag*tssM* se movilizó por conjugación a *S. marcescens* Db10 y se seleccionaron las colonias resistentes a estreptomicina. Como resultado de la recombinación homóloga entre la región interna de 400 pb clonada en pKNG101 y la copia cromosomal del gen *tssM*, la región 5' del gen se separa de la región 3' por la inserción del plásmido. Las mutaciones fueron confirmadas por PCR.

III.9. Técnicas bioquímicas y moleculares de proteínas

III.9.1. Preparación de extractos extracelulares de *S. marcescens*

10 ml de cultivo de las cepas de *S. marcescens*, crecidas en las condiciones indicadas, fueron centrifugados durante 10 min a 6000 g. Los sobrenadantes fueron filtrados con filtros de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,2 μ m; Minisart, Sartorius Stedim Biotech) y precipitados con TCA 12% (v/v) durante 2 h a 4°C. La mezcla fue centrifugada 20 min a 20000 g y lavada una vez con 1 ml de acetona (Merck) fría. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 60 μ l de solución de siembra de proteínas (Tris-HCl 120 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 0,5% (v/v); glicerol 2% (v/v); SDS 2% (p/v); y azul de bromofenol 0,002% (p/v)).

III.9.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico utilizando un kit comercial (Sigma), según especificación del fabricante. Brevemente, se agregaron 200 μ l de reactivo, conteniendo CuSO₄ y solución de ácido bicinonínico en una

proporción 1:50 en volumen, a 50 µl de muestra y se incubó a 37°C. A los 10 min, se midió absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas Biotek Elx808. Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina (Sigma).

III.9.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Antes de la siembra, las muestras se calentaron 5 min a 100°C en solución de muestra conteniendo: Tris-HCl 120 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 0,5% (v/v); glicerol 2% (v/v); SDS 2% (p/v); y azul de bromofenol 0,002% (p/v). Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución Tris base 25 mM; glicina 192 mM pH 8,3; y SDS 0,1% (p/v), a una intensidad de corriente constante de 20 mA. La concentración de poliacrilamida utilizada en los geles de separación fue de 10 o 15% (p/v), según se indique.

III.9.4. Tinción y visualización de geles con azul de Coomassie

Luego de la separación proteica por electroforesis indicada el apartado anterior, se incubaron los geles durante al menos 1 h con agitación constante en una solución conteniendo: azul brillante de Coomassie R 250 (Sigma) 0,25% (p/v); isopropanol (Merck) 30% (v/v); ácido acético (Merck) 10% (v/v). La solución fue previamente filtrada a través de un papel de filtro Whatman N°1. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos de los geles con agua caliente, hasta lograr que el fondo fuera claro. Los geles teñidos fueron visualizados y digitalizados usando el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), utilizando el modo de iluminación *Trans-white*.

III.9.5. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (Western blot)

Las muestras proteicas fueron sometidas a SDS-PAGE (sección III.9.4) y luego fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Life Sciences) en una cuba de transferencia semi-seca Trans-blot SD (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en solución Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 10% (v/v), durante 30 min con una intensidad de corriente constante de 300 mA. Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada durante 1 h con solución TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM) conteniendo 5% (p/v) de leche en polvo descremada. Posteriormente, se la incubó por 1 h con el anticuerpo primario en una dilución adecuada en solución TBS y, al cabo de esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 min con TBS. Después, la membrana se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo o anti-ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) o a peroxidasa de rabanito (Sigma) en una dilución 1/3000 en TBS. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS. Para el revelado a través de la fosfatasa alcalina, se incubó la membrana con 3 ml de la solución Tris 100 mM pH 9,0; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM conteniendo BCIP 0,15 mg/ml y NBT 0,3 mg/ml disueltos en

N,N-dimetilformamida 70% (v/v), hasta desarrollo de color. Los componentes NBT y BCIP reaccionan con la fosfatasa alcalina produciendo un precipitado insoluble color púrpura. En el caso de incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito, las membranas fueron reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia con kit *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), según las indicaciones del fabricante. Las imágenes fueron tomadas mediante el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), utilizando el modo *Chemi Hi-Sensitivity*. La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante densitometría utilizando el programa ImageJ.

III.10. Expresión y purificación de las proteínas RcsB y Hcp de fusión a cola de histidina

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pHisParallel::*rcsB-6xHis* se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina a 37°C con agitación hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio LB fresco y las células se incubaron a 37°C con agitación hasta una densidad óptica $DO_{600nm}=0,5$. En ese momento se agregó 0,5 mM de IPTG (Sigma) para inducir la expresión de RcsB-6XHis, y se incubó 4 h adicionales a 30°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 6000 g 4°C durante 5 min. Luego se resuspendieron en 20 ml de solución de sonicación (20 mM Tris pH 7,4; 0,5 M NaCl; 20 mM imidazol y fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y se sometieron a 10 pulsos de 15 s cada uno al 30% de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600. El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 30 min a 20000 g. La fracción soluble se sembró en una columna de Ni-NTA (HisTrap™ 1 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de sonicación: 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 20 mM imidazol. Luego de la unión de la proteína, se realizó un lavado de la columna con solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 80 mM imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína con solución de elución (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 250 mM imidazol). Se seleccionaron las fracciones de interés mediante análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Posteriormente, las fracciones seleccionadas se dializaron contra la solución 20 mM Tris pH 7,4 y 0,5 M NaCl.

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET::*hcp-6xHis*, creció en medio LB suplementado con kanamicina a 37°C con agitación hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio LB fresco y las células se incubaron a 37°C con agitación hasta una densidad óptica $DO_{600nm}=0,5$. En ese momento se agregó 0,5 mM de IPTG (Sigma) para inducir la expresión de Hcp-6XHis, y se incubó 4 h adicionales a 30°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 6000 g a 4°C durante 5 min. Luego se resuspendieron en 20 ml de solución de sonicación (20 mM Tris pH 8; 0,3 M NaCl; 10 mM imidazol y fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y se sometieron a 10 pulsos de 15 s cada uno al 30% de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600. El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 30 min a 20000 g. La fracción

soluble se sembró en una columna de Ni-NTA (HisTrap™ 1 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de sonicación: 20 mM Tris pH 8; 0,3 M NaCl; 10 mM imidazol. Luego de la unión de la proteína se realizó un lavado de la columna con solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8; 0,3 M NaCl y 20 mM imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína con solución de elución (20 mM Tris-HCl pH 8; 0,3 M NaCl y 250 mM imidazol). Se seleccionaron las fracciones de interés mediante análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Posteriormente, las fracciones seleccionadas se dializaron contra la solución 20 mM Tris pH 8 y 0,3 M NaCl.

III.11. Preparación de Anticuerpos anti-Hcp

Las muestras obtenidas de la purificación de Hcp-6XHis, se utilizaron para la preparación de anticuerpos anti-Hcp en conejo empleando una relación 1:1 con adyuvante incompleto de Freund, y siguiendo un protocolo de inyección como el descrito anteriormente (58).

III.12. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína

III.12.1. Fosforilación de oligonucleótidos

La reacción de fosforilación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen de 15 μ l, conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada con 45 μ Ci de [γ -³²P] ATP (3000 mCi/ μ mol; 10 μ Ci/ μ l; Perkin Elmer Inc.), 15 pmoles del oligonucleótido promSST6Fw o promSST6Rv y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega). Se incubó 30 min a 37°C, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65°C durante 10 min. Se separaron 3 μ l del oligonucleótido marcado para las reacciones de secuenciación (sección III.12.4) y el resto se utilizó para amplificar mediante PCR el fragmento de la región promotora del SST6.

III.12.2. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética del ADN

La interacción *in vitro* de la proteína RcsB-6xHis con la región promotora del SST6 fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética descrita por primera vez por Lane y colaboradores (190). El fragmento de ADN de 500 pb de la región promotora del SST6 fue amplificado por PCR utilizando los pares de cebadores promSST6Fw y promSST6Rv. Previamente se fosforiló el extremo 5' del cebador promSST6Fw con [γ -³²P] ATP, como se detalla en la sección anterior. Aproximadamente 15 ng de la sonda marcada fueron incubados con 22 pmoles de RcsB-6xHis purificada, por 30 min a 30°C. Esta mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l, conteniendo además *buffer* comercial React3 1X (Invitrogen), glicerol 10% (v/v), ADN de esperma de salmón 2,5 μ g/ml, BSA 25 μ g/ml y acetilfosfato 20 mM, utilizado para fosforilar al regulador RcsB (durante 30 min a 30°C, previo al agregado de la sonda). La mezcla se sembró en geles de poliacrilamida-bisacrilamida de concentración final 5% - 0,1% (p/v). Para los ensayos de competencia específica e inespecífica

se utilizó ADN no radioactivo amplificado a partir de los cebadores promSST6Fw y promSST6Rv o PromShIBFwEcoRI y PromShIBRvBamHI, respectivamente. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 80°C durante 60 min en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT), para luego ser incubados en un cartucho de exposición con pantalla intensificadora (Fujifilm) y escaneados usando el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Life Sciences) en el modo *Phosphorimager*.

III.12.3. Ensayo de protección de la ADNasa I (*DNA footprinting*)

La técnica de *DNA footprinting* se basa en la protección que brindan las proteínas de unión al ADN contra la digestión por la ADNasa I (191). Esta enzima interacciona con el ADN doble hebra, principalmente a través de contactos con el surco menor, e introduce un corte en el esqueleto azúcar-fosfato de una de las hebras.

Se realizaron reacciones de unión de manera análoga a la detallada en el punto anterior, utilizando 25 pmoles de la proteína RcsB-6xHis previamente fosforilada y aproximadamente 45 fmoles de ADN marcado correspondiente a la región promotora del SST6. Luego de 30 min de incubación a 37°C, se adicionaron 69 µl de H₂O destilada, 10 µl de solución 10X de ADNasa I compuesta por: Tris-HCl 400 mM pH 8,0; MgSO₄ 100 mM; CaCl₂ 10 mM; ADNasa I (RQ1 DNase, Promega) 1 U. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 90 s. La reacción se detuvo por el agregado de 90 µl de solución de corte conteniendo EDTA 20 mM pH 8,0 y 200 µl de fenol-cloroformo en una proporción 1:1 (v:v). Se centrifugó a 15000 g durante 10 min, se separó la fase acuosa, y se precipitó con 1 volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de amonio 5 M. Se incubó a -20°C durante 16 h, se centrifugó a 15000 g durante 15 min, se lavó con etanol 70% (v/v), y se secó a 37°C. El precipitado se resuspendió en 7 µl de solución de siembra desnaturante (NaOH 10 mM; formamida 95% (v/v); azul de bromofenol 0,05% (p/v); xilencianol 0,05% (p/v)) y se sembró en un gel de secuenciación como se describe en el punto siguiente.

III.12.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó utilizando el kit comercial fmol (Promega). Éste utiliza una modificación del método enzimático (192), en el que la enzima *Taq* polimerasa sintetiza una hebra complementaria del ADN que se desea secuenciar a partir del oligonucleótido marcado. El método se basa en la capacidad de la ADN polimerasa de incorporar 2',3'-didesoxinucleósidos trifosfato, los cuales, al carecer de hidroxilo 3', impiden que continúe la síntesis. De modo que se realizan cuatro reacciones, cada una en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato y de un didesoxinucleósido trifosfato. Al finalizar la reacción, cada tubo contiene una población de cadenas extendidas, todas con el mismo extremo 5' determinado por el cebador, y con extremos 3' variables, que terminan en un didesoxinucleósido específico. Se utilizaron como molde 0,05 pmoles del fragmento de ADN a

secuenciar y 1,5 pmoles del oligonucleótido marcado con ^{32}P y se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de secuenciación. Al finalizar, las reacciones se mezclaron con solución de siembra desnaturante de composición final: formamida 32% (v/v); NaOH 3 mM; azul de bromofenol 0,025% (p/v); xilencianol 0,025% (p/v).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de concentración 6% (p/v), en presencia de urea 6 M. Antes de la siembra, las muestras fueron calentadas a 70°C durante 2 min. Se utilizó TBE 1X como solución de electroforesis. La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60 W durante 4,5 h. Los geles se secaron a 80°C durante 60 min en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT). Finalmente se expuso el gel seco en un cartucho de exposición con pantalla intensificadora (Fujifilm) y se escaneó utilizando un equipo Typhoon FLA 7000 (GE Life Sciences) en el modo *Phosphorimager*.

III.13. Análisis bioinformáticos

III.13.1. Obtención de porcentajes de identidad de nucleótidos de los genes que codifican para el SST6

Mediante las secuencias nucleotídicas de los genes del *cluster* del SST6 de *S. marcescens* Db11 y utilizando la herramienta BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), se obtuvieron los porcentajes de identidad de nucleótidos.

III.13.2. Predicción del sitio de unión para RcsB en la región promotora de SST6

El motivo consenso para el sitio de unión de RcsB fue generado utilizando el algoritmo MEME (del inglés *multiple expectation maximization for motif elicitation*) (193) usando como datos los promotores que contienen motivos de unión a RcsB previamente identificadas. La matriz obtenida luego fue utilizada para buscar el motivo en la región promotora putativa del *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens* RM66262 mediante el algoritmo MAST (del inglés *motif alignment and search tool*) (194).

III.13.3. Análisis de la región promotora del SST6

Las secuencias de 13 genomas completos de *Serratia* spp. (*S. marcescens* subsp. *marcescens* Db11 [HG326223.1], *S. marcescens* SM39 [AP013063.1], *S. marcescens* CAV1492 [CP011642.1], *S. marcescens* B3R3 [CP013046.1], *S. marcescens* WW4 [CP003959.1], *S. marcescens* RCS-14 [CP012639.1], *S. marcescens* SmUNAM836 [CP012685.1], *S. marcescens* U363635 [CP016032.1], *S. marcescens* PWN146 [LT575490.1], *S. marcescens* SMB2099 [HG738868.1], *S. marcescens* AS1 [CP010584.1], *Serratia* sp. FS14 [CP005927.1] y *Serratia* sp. SCBI [CP003424.1]) fueron descargadas del NCBI. Los genes del SST6 fueron identificados utilizando la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para relacionar las secuencias codificantes de *S. marcescens* RM66262 con las secuencias de las otras cepas. Las cepas que

mostraron sintenia con el *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens* RM66262 fueron analizadas. Los 500 pb corriente arriba de *vgrG* fueron considerados como la región promotora del SST6 y el motivo de unión a RcsB fue buscado en dicha región.

III.14. Curvas de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron en medio LB o α -MEM suplementado con 10% de de suero fetal bovino y se monitorearon en un lector de microplacas Synergy2 (Biotek), durante un período de 14 h. Cultivos bacterianos crecidos hasta saturación fueron diluidos 1/100 en medio LB o α -MEM suplementado con 10% de de suero fetal bovino. Un volumen de 100 μ l de cada dilución se colocó en un pocillo de microplaca, y se incubó a 37°C en el lector de microplacas y se determinó la DO_{600nm} cada 60 min.

III.15. Medidas de actividad transcripcional en medio líquido

S. marcescens/ppromshIBA-gfp se cultivó durante 16 h a 30°C en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂. Se procedió a lavar las células con PBS y luego se midió la DO_{600nm} y la intensidad de fluorescencia emitida por GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25$ nm) en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia /DO_{600nm}.

III.16. Ensayos de competencia interbacteriana

III.16.1. Ensayos de competencia interbacteriana estándar

Los ensayos de competencia interbacteriana fueron realizados según fue publicado previamente (101), con modificaciones. Las células fueron cultivadas durante 16 h y normalizadas a una DO_{600nm}=0,5 y mezcladas en una relación 5:1 o 10:1 (atacante:presa), según lo indicado en cada caso. 25 μ l de la mezcla se sembraron en una placa de LB-agar y fueron incubadas a 37°C durante 4 o 6 h, según se indica. Luego de la incubación, las células fueron recuperadas con 1 ml de LB. Se plaquearon diluciones seriadas en medio sólido con antibiótico para permitir la selección de la cepa presa. Las células viables fueron reportadas como UFC/ml.

III.16.2. Ensayos de competencia interbacteriana con medida de reportero transcripcional

Para los ensayos de competencia con medida del reportero transcripcional, se realizaron ensayos de competencia interbacteriana (sección III.16.1) usando cepas que llevan el plásmido reportero ppromSST6 como presas o atacantes, según se indique en cada caso. Las cepas atacantes y presas fueron incubadas a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa) durante 4 h o 6 h, según se indica. Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC y medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25$ nm) en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia /UFC.

III.16.3. Ensayos de competencia interbacteriana tripartita

Para los ensayos de competencia tripartita, se realizaron ensayos de competencia interbacteriana (sección III.16.1) incubando las cepas atacantes y presas en relación 10:1:1 (atacante:presa agresiva:presa inocua) a 37°C durante 6 h. Luego de la incubación, las células fueron recuperadas con 1 ml de LB. Se plaquearon diluciones seriadas en medio sólido con antibiótico para permitir la selección bacteriana. Las cepas presas *S. marcescens* Db10 y *tssM* llevaban los plásmidos pBBR1MCS y pBBR1MCS-2, alternadamente. Se realizó un recuento de las UFC de cada presa y las células viables fueron reportadas como UFC/ml.

III.16.4. Ensayos de competencia interbacteriana tripartita con medida de reportero transcripcional

Las cepas atacantes, presas y reporteras fueron incubadas a 37°C en relación 10:1:1 (atacante:presa:reportera) durante 6 h. Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC y medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia /UFC.

III.17. Ensayos de actividad transcripcional utilizando el reportero ppromSST6**III.17.1. Medidas de actividad transcripcional en medio líquido**

Para los ensayos realizados en medio líquido, las cepas conteniendo el vector reportero ppromSST6 se cultivaron durante 16 h en las condiciones indicadas. Se procedió a lavar las células con PBS y luego se midió la $DO_{600\text{nm}}$ y la intensidad de fluorescencia emitida por GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia / $DO_{600\text{nm}}$.

III.17.2. Medidas de actividad transcripcional en medio sólido

Para los ensayos de actividad transcripcional en medio sólido, se cultivaron las cepas con el plásmido ppromSST6 durante 16 h a 37°C con agitación constante. Se realizó una dilución y se la incubó en una placa de LB-agar durante la cantidad de h indicadas a 37°C. Posteriormente, se recuperaron las células con 1 ml de LB y se lavaron con PBS. Luego se midió la $DO_{600\text{nm}}$ y la intensidad de fluorescencia emitida por GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia / $DO_{600\text{nm}}$.

III.17.3. Medidas de actividad transcripcional luego de incubación con lisado bacteriano

Cultivos saturados de *S. marcescens* RM66262 fueron lavados con PBS y resuspendidos en PBS previo a la sonicación. Diferentes volúmenes del lisado o de PBS, como control, fueron mezclados con la cepa reportera transcripcional *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 (diluida a $DO_{600\text{nm}}=0,5$) e incubados en una placa de LB-agar 4 h a 37°C.

Luego, las células fueron recuperadas en LB, lavadas con PBS y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) y de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

III.17.4. Medidas de actividad transcripcional luego de incubación con sobrenadante de competencia

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de competencia interbacteriana (sección III.16.1). Luego de una incubación de 4 h a 37°C , las células fueron resuspendidas en LB y se separó el sobrenadante. La cepa reportera *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 (diluida a $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$) fue mezclada con diferentes volúmenes de sobrenadante e incubada en una placa de LB-agar 4 h a 37°C . Luego, las células fueron recuperadas en LB, lavadas con PBS y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) y de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

III.17.5. Medidas de actividad transcripcional en ensayo de difusión

Los ensayos fueron realizados según fue descrito previamente (100). Brevemente, los cultivos bacterianos crecidos durante 16 h a 37°C fueron lavados con PBS, diluidos hasta $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$, mezclados en relación 5:1 (atacante:presa) y sembrados en una placa de LB-agar. Encima de la mezcla, se colocó un filtro con la cepa reportera transcripcional *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 (diluida a $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$) como mostrado en la Figura IV.25C. Luego de una incubación de 4 h a 37°C , las bacterias que crecieron sobre el filtro fueron resuspendidas en LB, lavadas con PBS y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) y de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

III.17.6. Medidas de actividad transcripcional en ensayo de estrés a envoltura bacteriana

S. marcescens RM66262/ppromSST6 fue cultivada durante 16 h a 37°C con agitación en LB suplementado con concentraciones sub-letales de SDS (Sigma), deoxicolato de sodio (Sigma) o polimixina B (Calbiochem). Los cultivos fueron lavados con PBS y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP ($\lambda_{\text{excitación}} = 485 \pm 35 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$) y de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en un lector de microplacas Synergy2. Se calculó la relación unidades de fluorescencia/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

Las concentraciones sub-letales determinadas son 0,025% SDS, 500 $\mu\text{g/ml}$ deoxicolato de sodio y 3 mg/ml polimixina B.

III.18. Ensayos de permeabilización de membrana

III.18.1. Ensayos de permeabilización de membrana externa

Los ensayos fueron realizados según fue descrito previamente (195). *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 fue cultivada toda la noche a 37°C con agitación en LB suplementado con concentraciones sub-letales de deoxicolato de sodio o polimixina B. Los cultivos fueron diluidos a $DO_{600nm}=0,6$ en *buffer* fosfato e incubados en una placa de 96 pocillos a 37°C con agitación. Cada pocillo contenía 25 μ L de nitrocefina (120 μ M). La absorbancia fue leída a 490 nm cada 4 min durante 60 min en un lector de microplacas Synergy2.

III.18.2. Ensayos de permeabilización de membrana interna

Los ensayos fueron realizados según fue descrito previamente (195). *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 fue cultivada toda la noche a 37°C con agitación en LB suplementado con concentraciones sub-letales de SDS. Los cultivos fueron diluidos a $DO_{600nm}=0,6$ en *buffer* fosfato e incubados en una placa de 96 pocillos a 37°C con agitación. Cada pocillo contenía 25 μ L de ONPG (2 mM, Sigma) en *buffer* fosfato. La absorbancia fue leída a 420 nm cada 4 min durante 60 min en un lector de microplacas Synergy2.

III.19. Ensayos de hemólisis en medio líquido

Muestras de sangre fueron lavadas repetidas veces con PBS (del inglés *phosphate buffered saline*; 8,5 g/L de NaCl, 1,4 g/L de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y 2,7 g/L de $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$), hasta obtener eritrocitos limpios. 200 μ L de eritrocitos se incubaron durante 1 h a 30°C sin agitación con 200 μ L de cultivos de *S. marcescens* cultivados durante 16 h a 30°C sin agitación en medio LB. Se incubaron los eritrocitos con agua destilada o con LB como controles de hemólisis completa y blanco de muestra, respectivamente. Luego de dicha incubación, se centrifugaron los cultivos durante 5 min a 6000 *g* y se tomó una muestra de 200 μ L del sobrenadante de la reacción, al cual se le midió la absorbancia a 562 nm. Además se midió la DO_{600nm} a 200 μ L de cada cultivo. Las medidas de absorbancia se realizaron usando un lector de microplacas Biotek ELX-808. A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calculó el porcentaje de hemólisis, considerando que el agua produce una hemólisis del 100%. Luego, los valores obtenidos fueron relativizados a la DO_{600nm} de cada cultivo.

En el caso de los ensayos de hemólisis en presencia de $NiCl_2$ (Sigma) o BAPTA-AM (Cayman Chemical), se agregaron los compuestos en las concentraciones 1 mM o 40 μ M, respectivamente.

III.20. Técnicas de cultivos celulares

III.20.1. Ensayos de protección a gentamicina o kanamicina

Los ensayos de protección con gentamicina o kanamicina fueron realizados según el protocolo previamente descrito (20). Células CHO fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% hasta alcanzar la confluencia. Cultivos de *S. marcescens*

saturados, crecidos a 30°C sin agitación, se centrifugaron 5 min a 6000 g y el sedimento celular se lavó y resuspendió con PBS. Se infectaron las células con los cultivos bacterianos, utilizando MOI (MOI, del inglés *multiplicity of infection*) 10. La placa se centrifugó 10 min a 2000 g y se incubó 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio de cultivo suplementado con 50 µg/ml gentamicina o 400 µg/ml kanamicina para eliminar las bacterias extracelulares. La placa se incubó a 37°C y, a los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 1% Tritón X-100 0,1% SDS. Las UFC (unidades formadoras de colonia) se determinaron mediante diluciones seriadas en medio LB-agar. Los porcentajes de bacterias intracelulares se calcularon en relación al inóculo bacteriano inicial utilizado para la infección de las células.

III.20.2. Ensayo de egreso

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. A 240 min p.i., las células fueron lavadas y se adicionó medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se recuperaron los sobrenadantes y se realizaron diluciones seriadas. Las UFC en sobrenadante (bacterias extracelulares) fueron calculadas por ml. En la Figura III.1 se muestra un esquema del ensayo de egreso.

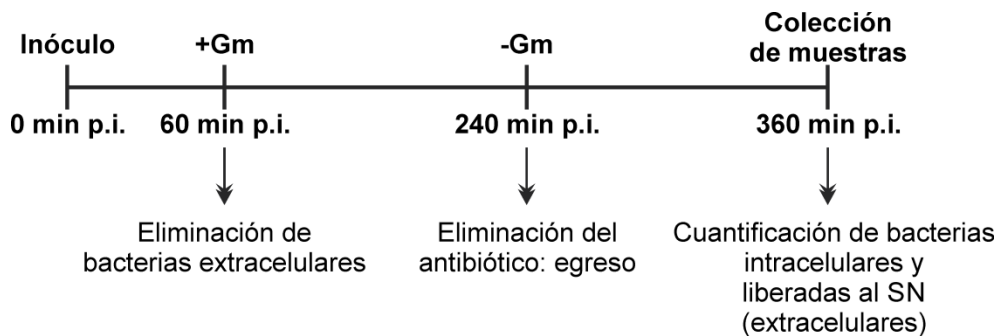


Figura III.1. Esquema representativo del ensayo de egreso. Gm: gentamicina. SN: sobrenadante.

III.20.3. Ensayo de protección a gentamicina con indicador de Ca²⁺

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. Las células CHO fueron crecidas sobre cubreobjetos hasta alcanzar la confluencia y fueron infectadas con *S. marcescens/pcherry*. A 210 min p.i., se adicionó 10 µM Fluo-3 AM (Biotium Inc.) y luego de 30 min de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se agregó medio DMEM FluoroBrite (Invitrogen) suplementado con 10% suero fetal bovino libre de antibiótico. Las células fueron analizadas por microscopía confocal *in vivo* utilizando el microscopio Zeiss LSM880. Se determinó el porcentaje de co-localización de las SeCV con Fluo-3 AM relativo al total de las SeCV. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición

Para los ensayos con agregado de NiCl₂, se realizaron las siguientes modificaciones. A 240 min p.i., se adicionó 1 mM NiCl₂, si es indicado, y a 270 min p.i., se cargó 2 µM Fluo-4 AM

(Invitrogen). Luego de 30 min de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se agregó medio DMEM FluoroBrite suplementado con 10% suero fetal bovino libre de antibiótico. Las células fueron analizadas por microscopía confocal *in vivo* utilizando el microscopio Zeiss LSM880. Se determinó el porcentaje de co-localización de las SeCV con Fluo-4 AM relativo al total de las SeCV. Se analizaron al menos 200 células.

En el caso de los ensayos en células no invadidas, se realizó una co-incubación de las células CHO no invadidas en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ y luego de 30 min, se cargó 2 μM Fluo-4 AM. Luego de 30 min de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se agregó medio DMEM FluoroBrite suplementado con 10% suero fetal bovino libre de antibiótico. Las células fueron analizadas por microscopía confocal *in vivo* utilizando el microscopio Zeiss LSM880. La intensidad de fluorescencia de GFP fue determinada utilizando el programa ImageJ relativo al total de células. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición.

III.20.4. Ensayo de protección a gentamicina con quelantes de Ca²⁺

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. A 240 min p.i., las células fueron lavadas y se adicionó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con 40 μM BAPTA-AM o las concentraciones de EGTA (Sigma) indicadas. A 360 min p.i., se recuperaron los sobrenadantes y la monocapa fue lavada con PBS y lisada con 1% Tritón X-100 0,1% SDS. Se realizaron diluciones seriadas y se determinaron las UFC. Los porcentajes de bacterias intracelulares se calcularon en relación al inóculo bacteriano inicial utilizado para la infección de las células y las UFC en sobrenadante fueron calculadas por ml.

Para evaluar el efecto del EGTA durante todo el ensayo, se adicionaron las concentraciones indicadas al momento de la invasión y se mantuvieron hasta los 360 min p.i.

En el caso del ensayo control, se adicionó simultáneamente 2 mM EGTA y 2 mM Ca²⁺ resultando en una concentración de Ca²⁺ libre equivalente a la presente en el medio α-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Todos los cálculos de las concentraciones de Ca²⁺ libre fueron realizados con el programa MaxChelator (web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm).

III.20.5. Ensayo de protección a gentamicina con ionóforo de Ca²⁺

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. A 240 o 300 min p.i., las células fueron lavadas y se adicionó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con 20 μM A23187 (Sigma). Luego de una incubación de 10 min, se recuperaron los sobrenadantes y se realizaron diluciones seriadas. Las UFC en sobrenadante fueron calculadas por ml.

III.20.6. Ensayos de protección a gentamicina en presencia de Bafilomicina A1 o NH₄Cl

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. A 240 min p.i., las células fueron lavadas y se adicionó medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares y extracelulares. Se agregó 100 nM bafilomicina A1 (Sigma) o 10 mM NH₄Cl (Sigma) a 60, 120 o 240 min p.i., según se indica en cada caso. Se determinaron las UFC intracelulares y extracelulares.

III.20.7. Ensayos de protección a gentamicina en inhibidores de canales de Ca²⁺

Los ensayos fueron realizados como los ensayos de protección a gentamicina descritos (sección III.20.1), con las siguientes modificaciones. A 240 min p.i., las células fueron lavadas y se adicionó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de NiCl₂, mibefradil, 2-APB (Cayman Chemical) o tapsigargina (Cayman Chemical). A 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares y extracelulares, según se indica en cada caso.

Para el ensayo de reversibilidad, se realizó un ensayo de protección a gentamicina, con las siguientes modificaciones. Se agregó 1 mM NiCl₂ al momento de la invasión. A 60 min p.i., las células fueron lavadas, se eliminó el NiCl₂, en los casos indicados, y se agregó 50 µg/ml gentamicina. A 240 min p.i. se agregó medio de cultivo libre de antibiótico y a 360 min p.i. se determinaron las UFC extracelulares. A distintos tiempos p.i., se determinaron las UFC intracelulares. La concentración de NiCl₂ fue mantenida durante los 60 min iniciales del ensayo, durante 240 min o durante 360 min (el ensayo completo), según lo indicado.

III.20.8. Ensayos de autofagia

Células CHO-EGFP-LC3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar 70% de confluencia. Cultivos de *S. marcescens* saturados, crecidos a 30°C sin agitación, se centrifugaron 5 min a 6000 g y el sedimento celular se lavó y resuspendió con PBS. Las células se infectaron con los cultivos bacterianos, utilizando MOI=10. La placa se centrifugó 10 min a 2000 g y se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A 120 min p.i., las células se fijaron con 3% paraformaldehído durante 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta, como se indica en la sección III.20.10. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal y el disparo de autofagia fue calculado como células con focos de LC3 en relación a las células totales no invadidas. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición.

En el caso de los ensayos en presencia de NiCl₂ o BAPTA-AM, se agregaron los compuestos en las concentraciones 1 mM o 40 µM, respectivamente.

III.20.9. Transfección de células epiteliales

Células CHO crecidas a 50% de confluencia en monocapa fueron transfectadas con el plásmido YFP-gal-8 utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante. Posteriormente para permitir la expresión de estas construcciones, las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Luego, las células se fueron infectadas con *S. marcescens/pcherry* en atmósfera de CO₂ al 5%. La placa se centrifugó 10 min a 2000 g y se incubó 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se agregó medio de cultivo suplementado con 50 µg/ml gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. La placa se incubó a 37°C y, a los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 3% paraformaldehído por 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta (sección III.20.10). Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia confocal. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición.

III.20.10. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Células epiteliales invadidas con *S. marcescens* fueron fijadas con 500 µl de 3% paraformaldehído durante 15 min y permeabilizadas con 0,1% de Tritón X-100. Subsecuentemente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas 1 h con el anticuerpo primario policlonal anti-*Serratia* (dilución 1/500) a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS y las células fueron incubadas durante 1 h con anticuerpos secundarios anti-conejo (dilución 1/150) conjugados a Cy3 (Zymed) o a Alexa Fluor 647 (Molecular Probes). Las células fueron sometidas a 3 lavados de 10 min cada uno con PBS y montadas con el reactivo Slow Fade Antifade en glicerol/PBS (Molecular Probes). Finalmente, las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal Zeiss LSM880. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición.

III.20.11. Video microscopía

Se realizó un ensayo de protección a gentamicina (sección III.20.1) con la cepa *S. marcescens/pgfp* y con una MOI=10. A 240 min p.i., las células fueron lavadas y se agregó medio DMEM FluoroBrite libre de antibiótico suplementado con 10% suero fetal bovino. Inmediatamente, las células fueron analizadas *in vivo* por microscopía confocal, utilizando un microscopio Zeiss LSM880 y se capturaron imágenes cada 30 s entre los 352 min p.i. y 360 min p.i.

Previamente se evaluó que en el medio DMEM FluoroBrite suplementado con 10% suero fetal bovino, los porcentajes de invasión y egreso son equivalentes a los obtenidos en α -MEM.

III.20.12. Ensayos de viabilidad celular

III.20.12.1. Ensayo de reducción de MTT

Se realizó un ensayo de protección a gentamicina (sección III.20.1) y a 360 min p.i., las células fueron lavadas con PBS y se agregó 0,5 µg/ml bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma). La placa fue incubada durante 2 h y luego los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO. La absorbancia a 570 y 630 nm fue medida. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado siguiendo la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \left(1 - \frac{(\text{Abs muestra } 570 \text{ nm} - \text{Abs muestra } 630 \text{ nm})}{(\text{Abs Control negativo } 570 \text{ nm} - \text{Abs Control negativo } 630 \text{ nm})} \right) \times 100$$

En el caso de los ensayos de citotoxicidad en presencia de NiCl₂ o BAPTA-AM, las células CHO fueron incubadas con *S. marcescens* con una MOI=20 con o sin 40 µM BAPTA-AM o 1 mM NiCl₂. A 180 min p.i., las células fueron lavadas con PBS para eliminar las bacterias y se agregó 0,5 µg/ml MTT. La placa fue incubada durante 2 h y luego los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado siguiendo la fórmula indicada previamente.

Para corroborar la reversibilidad de la inhibición, se realizó el ensayo descrito previamente y a 180 min p.i., las células fueron lavadas con PBS para eliminar las bacterias y se agregó medio suplementado con 50 µg/ml gentamicina y con 1 mM NiCl₂, si es indicado. A 240 min p.i., se lavaron las células y se agregó 0,5 µg/ml MTT. La placa fue incubada durante 2 h y luego los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado siguiendo la fórmula indicada previamente.

III.20.12.2. Ensayo de Vivas/Muertas

Se realizó un ensayo de protección a gentamicina (sección III.20.1) y a 360 min p.i., las células fueron lavadas y se las incubó con una mezcla 1:1 del kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen) durante 15 min. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 3% paraformaldehído. Las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta, como se indica en la sección III.20.10. El control positivo fue realizado incubando células no invadidas con 0,1% Tritón X-100 y el control negativo son células sin invadir y sin tratar. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal utilizando un microscopio Zeiss LSM880. Se analizaron al menos 200 células en cada repetición.

III.20.12.3. Tinción con yoduro de propidio

Se realizó un ensayo de protección a gentamicina (sección III.20.1) utilizando *S. marcescens/pgfp* y a 360 min p.i., se recuperó el sobrenadante y la monocapa celular fue

despegada utilizando 0,05% tripsina, 9,5 mM EDTA en PBS. Ambas muestras fueron teñidas *in vivo* con 1 μ M ioduro de propidio (Invitrogen) durante 15 min. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 3% paraformaldehído. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo utilizando el equipo FACS Aria Cell Sorter.

III.20.13. Ensayo de susceptibilidad a gentamicina en bacterias extracelulares

Los ensayos de susceptibilidad a gentamicina fueron realizados según lo descrito previamente (175). Brevemente, se realizó un ensayo de egreso (sección III.20.2) y se colectó el sobrenadante. Dicho sobrenadante fue sometido a centrifugaciones seriadas (1. 200 g por 5 min, 2. 200 g por 5 min, 3. 310 g por 5 min) para eliminar los restos de células muertas y fue tratado con 30 μ g/ml gentamicina en presencia o ausencia de 0,1% Tritón X-100 durante 1 h. Las bacterias de cada condición fueron lavadas con PBS y plaqueadas en LB-agar.

III.20.14. Ensayos de actividad N-Acetil- β -d-gluocosaminidasa (β -hexosaminidasa)

Células CHO fueron tratadas con 40 μ M BAPTA-AM durante 120 min o 20 μ M ionóforo A23187 durante 10 min en medio DMEM FluoroBrite suplementado con 10% suero fetal bovino. Se utilizó este medio ya que el rojo fenol interfiere con las longitudes de excitación/emisión utilizados en este ensayo. Luego del tratamiento, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados para los ensayos de β -hexosaminidasa y la monocapa celular fue recuperada para la inmunodetección de α -tubulina. 500 μ l del sobrenadante fue incubado con 1 mM 4-metil-umberiferil-N-acetil- β -D-gluocosaminida (Sigma) en solución citrato-fosfato, pH 6 durante 10 min a 37°C. La reacción fue medida en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) ($\lambda_{\text{excitación}} = 345$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 450$ nm). La línea de base fue medida con medio DMEM FluoroBrite suplementado con 10% suero fetal bovino. Las veces de cambio fueron calculadas relativo al valor obtenido para células sin tratar.

III.20.15. Inmunodetección de α -tubulina

La monocapa celular utilizada para el ensayo de β -hexosaminidasa fue lisada con solución de siembra de SDS-PAGE. Las muestras de proteínas totales durante separadas en un gel de poliacrilamida 12% (30 μ g por calle) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL. Posteriormente se realizó una inmunodetección con un anticuerpo primario anti- α -tubulina (sección III.9.6).

III.21. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SigmaPlot, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un solo factor y el test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer. Los asteriscos en los gráficos denotan los valores que presentan diferencias estadísticas.

IV. Capítulo I. Regulación del sistema de secreción de tipo VI de *S. marcescens* y rol en competencia interbacteriana.

IV.1. INTRODUCCIÓN

Una característica que le confiere a *Serratia* una ventaja al colonizar nichos ambientales es la capacidad de competir con otros microorganismos que forman parte de ese nicho. Los sistemas de secreción de tipo VI (SST6) permiten la translocación de efectores al interior de la célula blanco luego del contacto con la misma. Estos efectores suelen ser letales, por lo tanto, los SST6 pueden ser utilizados para eliminar las células que se encuentran en la proximidad (70).

Estructuralmente, los SST6 están formados por 13 componentes esenciales que se organizan en dos complejos: una estructura dinámica similar a una cola de bacteriófago invertido y un complejo asociado a membrana. El complejo asociado a membrana tiene la función de anclar el SST6 a la envoltura celular y está compuesto por dos proteínas de membrana interna (TssL y TssM) y una lipoproteína de membrana externa (TssJ). Hcp, proteína principal del otro complejo, forma anillos hexaméricos que polimerizan formando un tubo cubierto en su extremo por un trímero de VgrG (proteína responsable de interactuar con la membrana de las células blanco). Esta aguja está rodeada por una estructura tubular compuesta por polímeros de TssB y TssC y sus contracciones permiten la expulsión de la estructura formada por Hcp y su inserción en las células target, permitiendo la translocación de efectores proteicos. Es importante mencionar que los genes que codifican para estos componentes estructurales y otros que no fueron mencionados se encuentran en un *cluster* génico. Dentro de los mismos, suele haber otros genes que codifican para proteínas accesorias, regulatorias y efectores del sistema (196).

En 2011, se reportó que *S. marcescens* Db10 tiene un SST6 con actividad antibacteriana y que dicha actividad está dada, al menos en parte, por 9 efectores. Los efectores están codificados en operones policistrónicos junto con genes que codifican para sus respectivas proteínas de inmunidad, para evitar el daño a células hermanas (101–104).

Si bien hay cada vez más reportes de los detalles estructurales y del ensamblado del SST6, los mecanismos que permiten la regulación de la expresión de un sistema tan complejo y energéticamente costoso están lejos de ser conocidos. Por lo tanto, en este capítulo de Tesis se propone estudiar los mecanismos que regulan la expresión del SST6 de *S. marcescens*.

porcentajes de identidad de aminoácidos de los genes que codifican para las proteínas efectoras y sus proteínas de inmunidad asociadas.

Gen	% identidad nucleotídica	Gen	% identidad nucleotídica	Gen	% identidad nucleotídica
<i>vgrG</i>	94	<i>tssC</i>	98	<i>tagJ</i>	95
<i>tssJ</i>	96	<i>rap1a</i>	97	<i>tssE</i>	95
<i>tssK</i>	97	<i>ssp1</i>	96	<i>tssF</i>	96
<i>tssL</i>	97	<i>hcp</i>	99	<i>tssG</i>	95
<i>tssM</i>	95	<i>rap2a</i>	96	<i>clpV</i>	97
<i>tagF</i>	95	<i>rap2b</i>	98	<i>ppkA</i>	94
<i>tssA</i>	95	<i>fha</i>	94	<i>vgrG</i>	96
<i>tssB</i>	98	<i>pppA</i>	97		

Tabla IV.1. Identidad nucleotídica de los genes del *cluster* del SST6 de *S. marcescens* RM66262 en comparación con *S. marcescens* Db11.

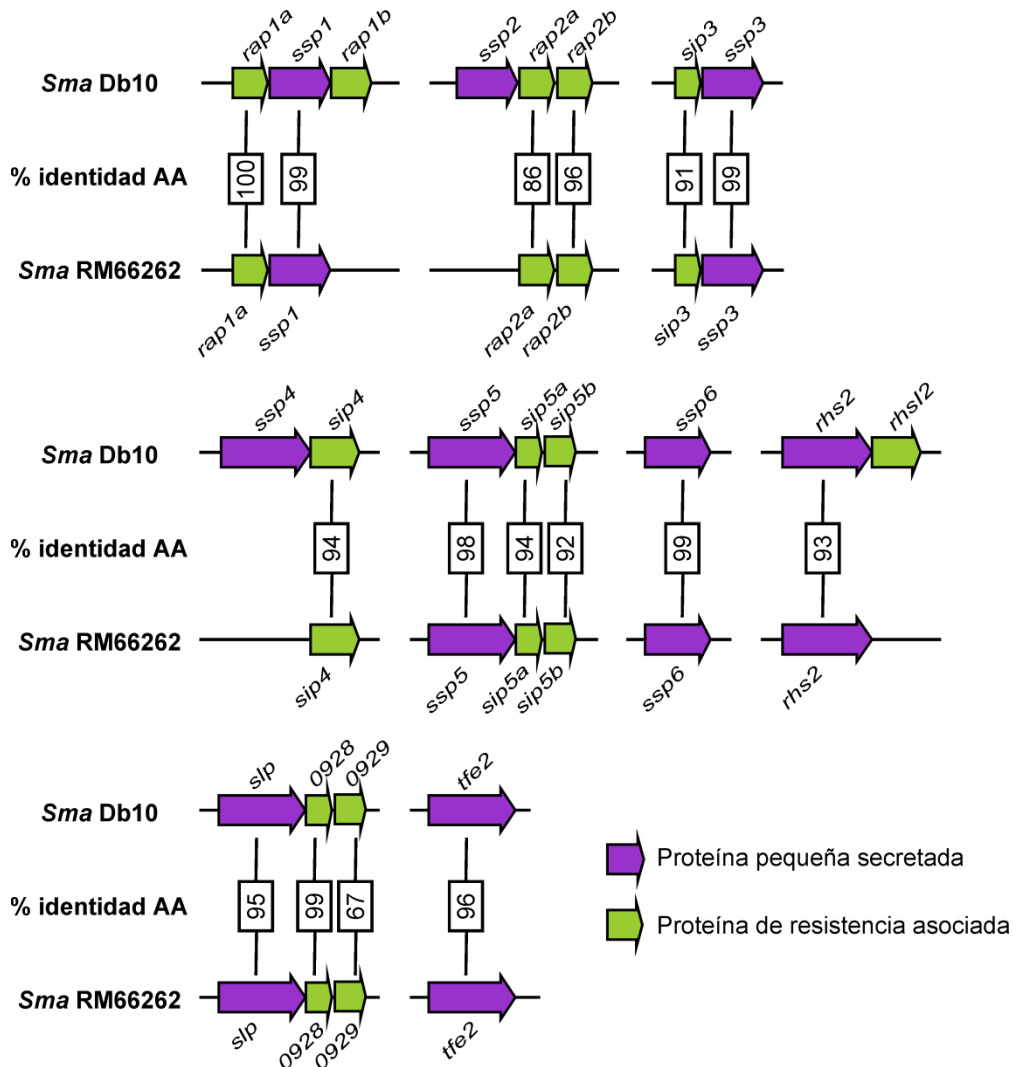


Figura IV.2. Comparación de los efectores (proteínas pequeñas secretadas) y las proteínas de inmunidad (proteínas de resistencia asociadas) codificados en los genomas de *S. marcescens* (Sma) RM66262 y *S. marcescens* Db11. Las flechas violetas indican los genes codificantes para efectores y las verdes para proteínas de inmunidad asociadas. Se muestran los porcentajes de identidad de aminoácidos obtenidos al comparar las secuencias de ambas cepas. Los genes SMDB11_0928 (0928) y SMDB11_0929 (0929) codifican para putativas proteínas de inmunidad asociadas a SIp. El gen *rhs1* se encuentra ausente en el genoma de *S. marcescens* RM66262.

Es interesante destacar que, a pesar de presentar un alto porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos, existen diferencias entre los efectores y las proteínas de inmunidad codificados por cada cepa (Figura IV.2). Estas diferencias suelen ser normales entre aislamientos de la misma especie y permiten que cada cepa pueda atacar o defenderse de otras. Por ejemplo, *S. marcescens* RM66262 no posee el gen *ssp4* pero codifica para Sip4, su proteína de inmunidad asociada. La expresión de Sip4 le serviría para defenderse de un ataque ocasionado por una cepa que exprese Ssp4.

Si bien en la Figura IV.2 no aparecen proteínas efectoras presentes en *S. marcescens* RM66262 y ausentes en *S. marcescens* Db11 no se puede descartar su existencia, ya que se desconocen los efectores codificados por *S. marcescens* RM66262.

IV.2.2. Análisis funcional del SST6

Según lo reportado en la literatura, la funcionalidad del SST6 puede ser evaluada por el transporte de Hcp al medio extracelular (185, 197). Considerando que *Serratia* presenta termorregulación de diversos fenotipos (56, 58, 129) y con el fin de evaluar si el SST6 de *S. marcescens* RM66262 es funcional en las condiciones ensayadas, se realizó una inmunodetección de Hcp en muestras de proteínas secretadas. Se cultivaron las cepas indicadas durante 16 h con agitación a 30°C o a 37°C, según lo indicado en cada caso. Los sobrenadantes de dichos cultivos se concentraron por precipitación con TCA y se separaron mediante un SDS-PAGE. Posteriormente se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-Hcp y un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga. Los niveles de Hcp secretados se cuantificaron mediante densitometría. Un menor nivel de Hcp secretado refleja una actividad del SST6 reducida.

Como se puede observar en la Figura IV.3, *Serratia* secreta Hcp a ambas temperaturas ensayadas, por lo tanto se puede inferir que el SST6 de *S. marcescens* RM66262 es funcional tanto a 30°C como a 37°C. Dado que no se detecta Hcp en los sobrenadantes de la cepa mutante *tssM*, dicha cepa no expresa un SST6 funcional. Esta observación está de acuerdo con lo reportado previamente para *Serratia* y otras bacterias, en las cuales mutar un componente estructural del SST6 genera una pérdida completa de su funcionalidad (101, 197). Respecto a la cepa *pppA*, se detecta un mayor nivel de Hcp secretado en comparación con la cepa silvestre, sólo cuando los cultivos son crecidos a 30°C. Estos resultados son congruentes con lo reportado para *P. aeruginosa*. Como se mencionó en la introducción general, en dicho modelo, el ensamblado del SST6 es regulado de forma post-traducciona por una vía de fosforilación de treonina y las cepas mutantes en la fosfatasa PppA, presentan un sistema constitutivamente activo (99).

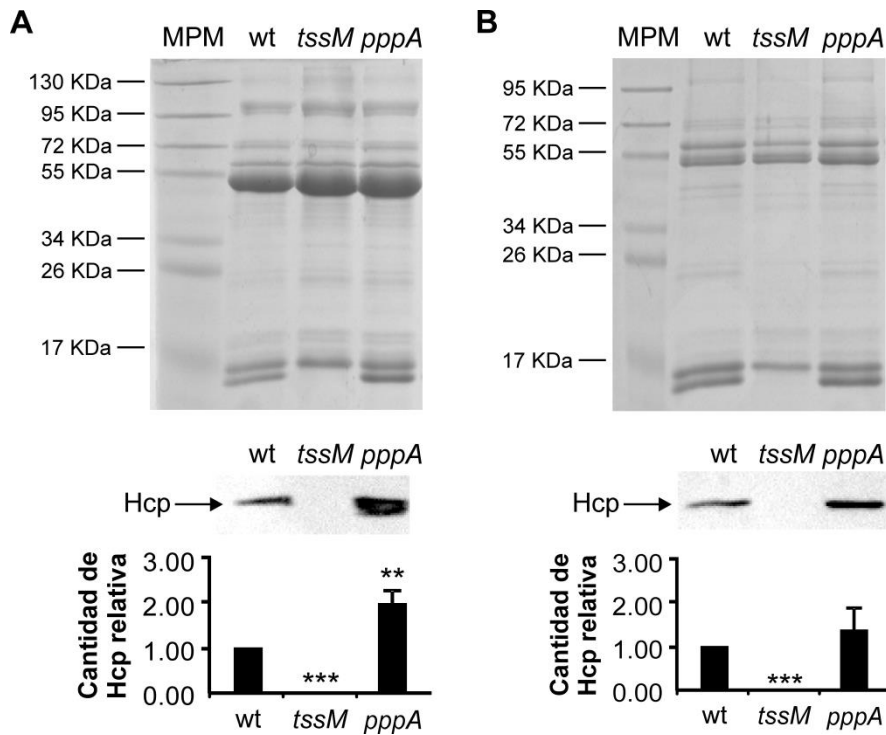


Figura IV.3. Análisis de la funcionalidad del SST6 mediante la secreción de Hcp. Se cultivaron las bacterias durante 16 h con agitación constante a **A)** 30°C o **B)** 37°C. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron, concentraron por precipitación con TCA y resuspendieron en solución de siembra desnaturalizante. Las muestras se separaron mediante un SDS-PAGE al 15% y se realizó una transferencia y posterior inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-Hcp (panel medio). Un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga (panel superior). En la parte inferior de la figura se muestran los niveles de Hcp secretado cuantificados por densitometría y relativos al valor obtenido para la cepa silvestre a cada temperatura. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre a cada temperatura. Se muestran imágenes representativas de los geles. MPM: Marcador de peso molecular.

Otro modo de evaluar la funcionalidad del SST6 es mediante la realización de ensayos de competencia interbacteriana (185, 198). Para ello, se realiza una co-incubación entre una cepa atacante y una cepa presa y, luego de un tiempo determinado, se hace un recuento de UFC de la cepa presa. Para evaluar si *S. marcescens* RM66262 es capaz de eliminar a *E. coli* de un modo dependiente del SST6, se realizaron ensayos de competencia interbacteriana utilizando *S. marcescens* RM66262 (silvestre o mutante en *tssM*) como atacante y *E. coli* MC4100 como presa. Las cepas atacante y presa se co-incubaron en relación 5:1 durante 4 h a 37°C. Posteriormente, se realizó un recuento de UFC de *E. coli*. Como control se utilizó como atacante *E. coli* DH5 α , una cepa de laboratorio que, al igual que la cepa MC4100, no posee un SST6 codificado en su genoma.

En los ensayos de competencia interbacteriana recuperar un menor número de UFC de la cepa presa en comparación con las obtenidas en la condición control es indicativo de una mayor capacidad antibacteriana de la cepa atacante. En la Figura IV.4 se puede observar que *S. marcescens* RM66262 silvestre es capaz de eliminar a *E. coli* MC4100 de un modo dependiente de su SST6, ya que la cantidad de UFC recuperadas luego de la incubación con la cepa silvestre es significativamente menor que con la mutante *tssM* o que en la condición control.

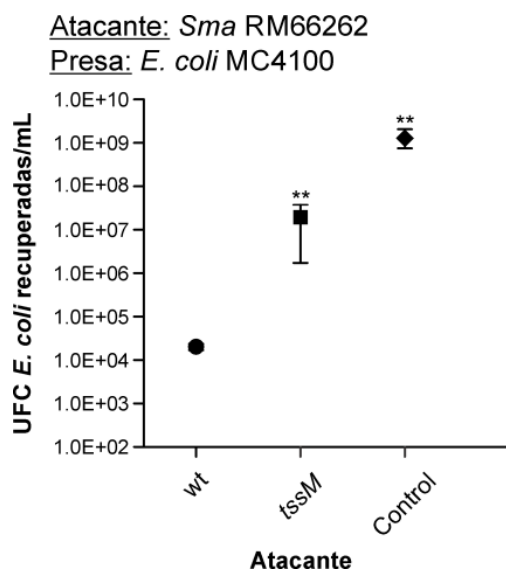


Figura IV.4. Análisis de la funcionalidad del SST6 mediante ensayos de competencia interbacteriana. *S. marcescens* (*Sma*) RM66262 silvestre (wt) o mutante en *tssM* (atacantes) y *E. coli* MC4100 (presa) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. Se co-incubó *E. coli* DH5 α con la presa como control. Se realizó un recuento de UFC de *E. coli* MC4100. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.E.M. para cuatro ensayos independientes (** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido al utilizar la cepa silvestre como atacante.

Los resultados obtenidos en los ensayos de competencia y de detección de Hcp secretado permiten concluir que, en las condiciones ensayadas, *S. marcescens* RM66262 tiene un SST6 activo, funcional y capaz de eliminar a *E. coli*.

IV.2.3. Análisis de la termorregulación del SST6

Como se mencionó previamente, *S. marcescens* presenta termorregulación de diversos fenotipos, como la expresión del flagelo, de la proteasa PrtA y la producción de OMVs (56, 58, 129). Con el objetivo de analizar la actividad transcripcional del SST6, se construyó un plásmido reportero fluorescente (ppromSST6) fusionando de forma transcripcional la región promotora del *cluster* del SST6 (500 pb que se encuentran corriente arriba del ATG de *vgrG*, Figura IV.1) al gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP. Dicho plásmido se conjugó a *S. marcescens* silvestre y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm} , luego de cultivar las bacterias durante 16 h a 30°C o 37°C, con o sin agitación constante, según se indica en cada caso. Se observó que la expresión transcripcional del SST6 de *S. marcescens* RM66262 es dependiente de la temperatura y de la aireación de los cultivos bacterianos, siendo un 77% mayor a 37°C con agitación que a 30°C con agitación (Figura IV.5A). Al comparar ambas temperaturas de crecimiento en ausencia de agitación, se observó que la actividad del reportero a 37°C es un 89% mayor que la obtenida a 30°C (Figura IV.5A). Considerando los resultados obtenidos, 37°C con agitación fue la condición de crecimiento elegida para continuar con los ensayos, ya que fue la condición a la que se presentó la mayor actividad transcripcional del sistema.

Posteriormente, se evaluó si la termorregulación de la expresión transcripcional se encuentra conservada en otras cepas de *S. marcescens*. Para ello, se conjugó el plásmido reportero transcripcional a la cepa *S. marcescens* Db10 y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm} , luego de crecer los cultivos bacterianos en las condiciones indicadas anteriormente. El patrón de expresión obtenido fue equivalente al de la cepa RM66262 (Figura IV.5B), si bien la variación porcentual observada

entre 30°C y 37°C no fue tan elevada. Por lo tanto, se puede concluir que la termostabilización y el efecto de oxigenación de los cultivos en la expresión del SST6 están conservados en ambas cepas de *S. marcescens*.

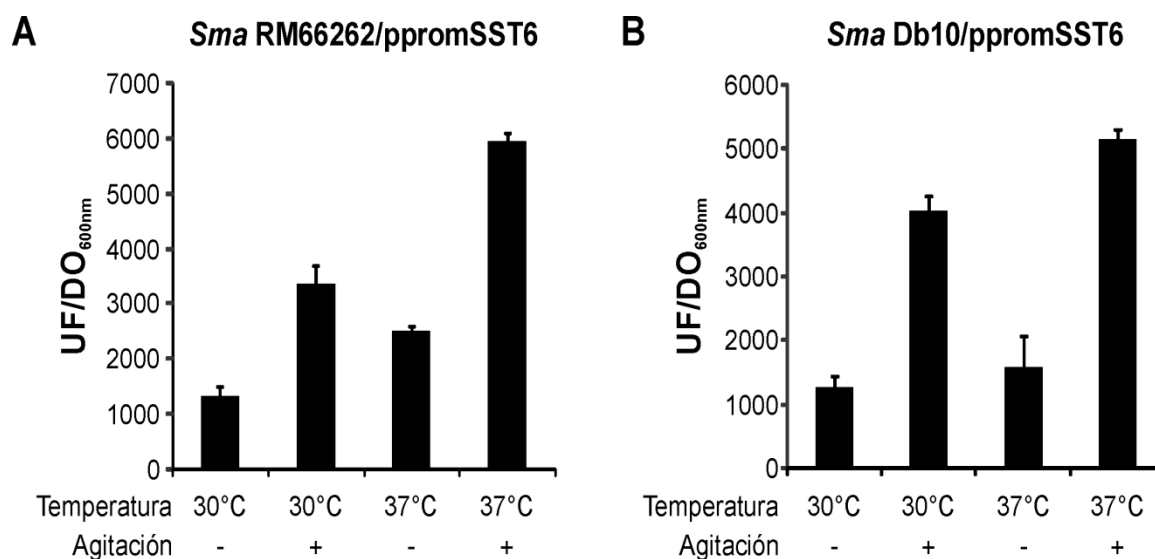


Figura IV.5. Evaluación de la termostabilización de la transcripción del SST6. Se cultivaron las cepas de *S. marcescens* (Sma) **A)** RM66262 o **B)** Db10 durante 16 h con o sin agitación constante a 30°C o 37°C, según lo indicado. Las cepas contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP (UF) y la DO_{600nm} y se graficó la relación UF/DO_{600nm}. Se muestran los promedios ± S.D. para tres ensayos independientes.

IV.2.4. Búsqueda de factores regulatorios del SST6

Con el propósito de examinar los mecanismos regulatorios que gobiernan la expresión transcripcional del SST6, se conjugó el plásmido reportero fluorescente a una serie de cepas mutantes de *S. marcescens* RM66262 y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm}, luego de cultivar las cepas a dos temperaturas distintas. Se evaluó la cepa mutante *tssM* para examinar si hay una retroalimentación en la regulación del SST6. Considerando que previamente se reportó que en *V. cholerae* la cascada regulatoria flagelar controla la expresión del SST6 (199), se decidió utilizar cepas mutantes en *flhD* (regulador flagelar maestro) y *fliA* (factor sigma alternativo de la ARN polimerasa σ^{28}). Puesto que el SST6 de *Edwardsiella tarda* está regulado por el sistema de transducción de señales PhoPQ (200), se incluyó a la mutante en *phoP* en los ensayos. Además, se decidió ensayar la mutante en *rCSB*, el regulador de respuesta del sistema regulador global Rcs, ya que en el laboratorio se reportó que dicho sistema regula diversos fenotipos en *Serratia*, incluyendo la motilidad mediada por flagelo (58), la producción de hemolisina (21) y la secreción de OMVs (129). Por último, y considerando que muchos de los genes regulados por el sistema Rcs también son regulados por el sistema CpxRA, se incluyó la cepa mutante en *cpxR*.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión transcripcional que presentan las mutantes al compararlas con la cepa silvestre, excepto en el caso de la mutante *rCSB* (Figura IV.6). Este resultado indica que, en las condiciones ensayadas, la expresión del SST6 no está regulada a nivel transcripcional por el

sistema CpxRA, el sistema PhoPQ y la cascada regulatoria flagelar, y que no existe una retroalimentación en la regulación del SST6. En contraste, el resultado obtenido para la mutante *rscB* permite inferir que el sistema Rcs es un activador de la expresión del SST6, ya que se obtiene un nivel transcripcional un 29% o 35% menor que el obtenido para la cepa silvestre a 30°C o 37°C, respectivamente (Figura IV.6).

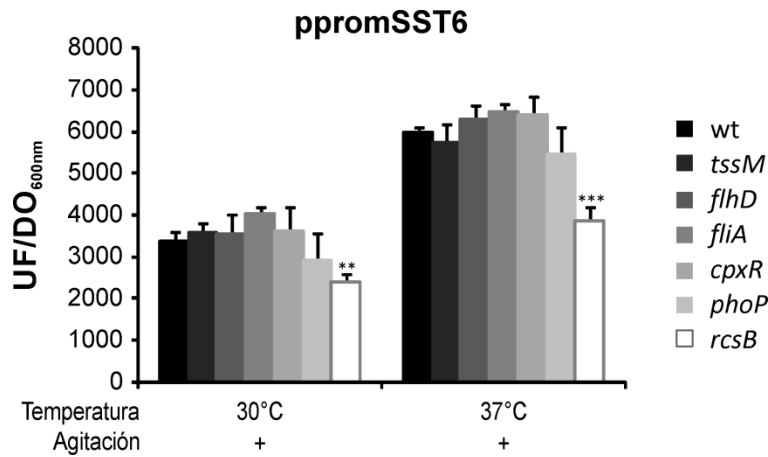


Figura IV.6. Búsqueda de factores regulatorios del SST6 utilizando el plásmido reportero transcripcional. Se cultivaron las cepas indicadas de *S. marcescens* RM66262 durante 16 h con agitación constante a 30°C o 37°C, según lo indicado. Las cepas contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP (UF) y la DO_{600nm} y se graficó la relación UF/DO_{600nm}. Se muestran los promedios ± S.D. para tres ensayos independientes (** p<0,01 y *** p<0,001). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre, en cada condición.

Para corroborar la disminución en la actividad transcripcional observada en la mutante *rscB*, se realizaron ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcritos de los genes *vgrG* y *hcp*. Se extrajo ARN de la cepa silvestre y de la mutante *rscB* crecidas a 37°C hasta fase exponencial y se llevó a cabo la retro-transcripción. Se realizó la real time PCR con los siguientes pares de oligonucleótidos: *vgrG*RTFw y *vgrG*RTRv; *hcp*RTFw y *hcp*RTRv. La expresión relativa de los genes *vgrG* y *hcp* en la cepa mutante *rscB* se encuentra reducida un 60% y 40%, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre (Figura IV.7). De este modo, se puede corroborar el fenotipo observado en los ensayos de actividad transcripcional realizados utilizando el plásmido reportero ppromSST6.

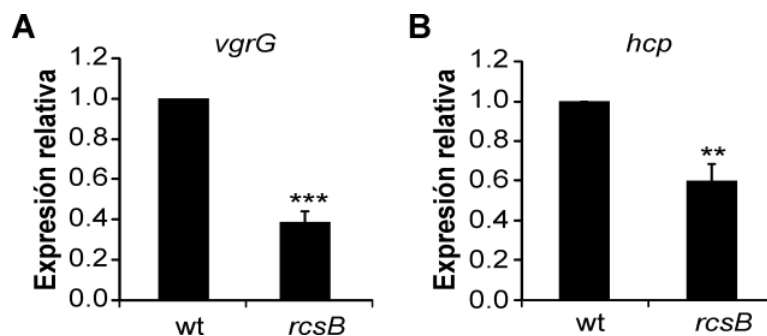


Figura IV.7. Cuantificación de los transcritos de *vgrG* y *hcp* mediante RT-qPCR. Se extrajo ARN total de las cepas *S. marcescens* silvestre (wt) o mutante *rscB* crecidas hasta fase exponencial a 37°C. Se midió la expresión de **A) *vgrG*** y **B) *hcp*** por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los valores se obtuvieron por método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando los niveles de transcritos del gen 16S como referencia. Se normalizó la expresión de los genes, considerando el valor obtenido para la cepa silvestre como la unidad. Se muestran los promedios ± S.D. para tres ensayos independientes (** p<0,01 y *** p<0,001). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre.

Dado que los ensayos de competencia interbacteriana son realizados en medio sólido, se examinó si se conserva la regulación transcripcional del SST6 RcsB-dependiente al realizar

los ensayos con el reportero transcripcional en una placa de LB-agar. Para ello, se incubaron las cepas *S. marcescens* silvestre o *rcsB* en medio sólido a 37°C y, a los tiempos indicados, se recuperaron las muestras y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm} .

Como se puede observar en la Figura IV.8, la regulación transcripcional del SST6 dependiente de RcsB se verifica al realizar los ensayos en medio sólido. Por lo tanto, el reportero fluorescente *ppromSST6* constituye una herramienta adecuada para ser utilizado en las condiciones de ensayos de competencia interbacteriana.

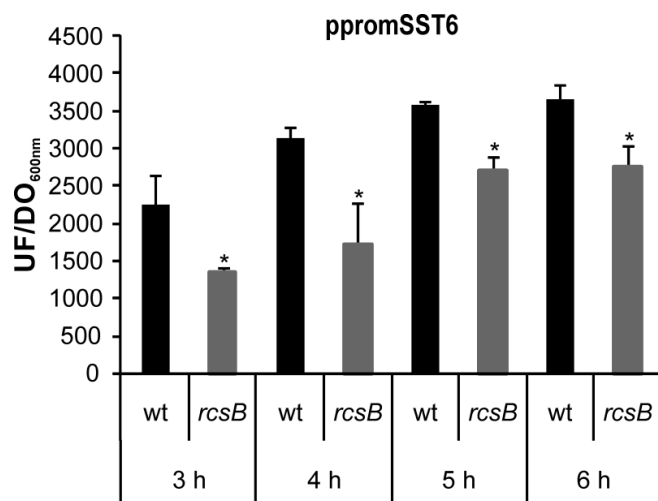


Figura IV.8. Regulación transcripcional del SST6 en medio sólido. Se cultivó *S. marcescens* RM66262 silvestre (wt) o mutante *rcsB* durante 16 h con agitación constante a 37°C. Las cepas contienen el plásmido reportero transcripcional *ppromSST6*. Se sembró una dilución de dicho cultivo en una placa de LB-agar y se la incubó a 37°C durante la cantidad de h indicadas. Posteriormente, las bacterias se recuperaron y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP (UF) y la DO_{600nm} y se graficó la relación UF/DO_{600nm} . Se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos independientes (* $p < 0,05$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre a cada tiempo.

Puesto que la regulación RcsB-dependiente se detectó a nivel transcripcional, se analizó a su vez si alguno de los reguladores estudiados modifica la actividad del SST6 de forma post-transcripcional. Para ello, se cultivaron las cepas anteriormente indicadas durante 16 h a 37°C con agitación. Los sobrenadantes de dichos cultivos se concentraron por precipitación con TCA y se separaron mediante un SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-Hcp y un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga. Los niveles de Hcp secretado se cuantificaron mediante densitometría. Como se mencionó previamente, detectar menores niveles de Hcp secretados indica una menor actividad del SST6.

En la Figura IV.9 se puede observar que las cepas mutantes en *fliA*, *flhD*, *cpxR* y *phoP* presentan niveles de Hcp secretados similares a los de la cepa silvestre. Por ende, se puede inferir que el SST6 no está controlado de forma post-transcripcional por los sistemas CpxRA, PhoPQ y por la cascada regulatoria flagelar, en las condiciones ensayadas. En contraste, la mutante *rcsB* presenta menores niveles de Hcp secretado que la cepa silvestre y este fenotipo se complementa al expresar *rcsB* desde un plásmido (Figura IV.9B). Estos resultados son congruentes con los observados en el ensayo de actividad transcripcional (Figura IV.6 y Figura IV.7), ya que la mutante *rcsB* tiene un menor nivel transcripcional del SST6 que la cepa silvestre. En consecuencia, se puede concluir que RcsB actúa como un activador de la

transcripción del *cluster* génico del SST6, modulando su actividad.

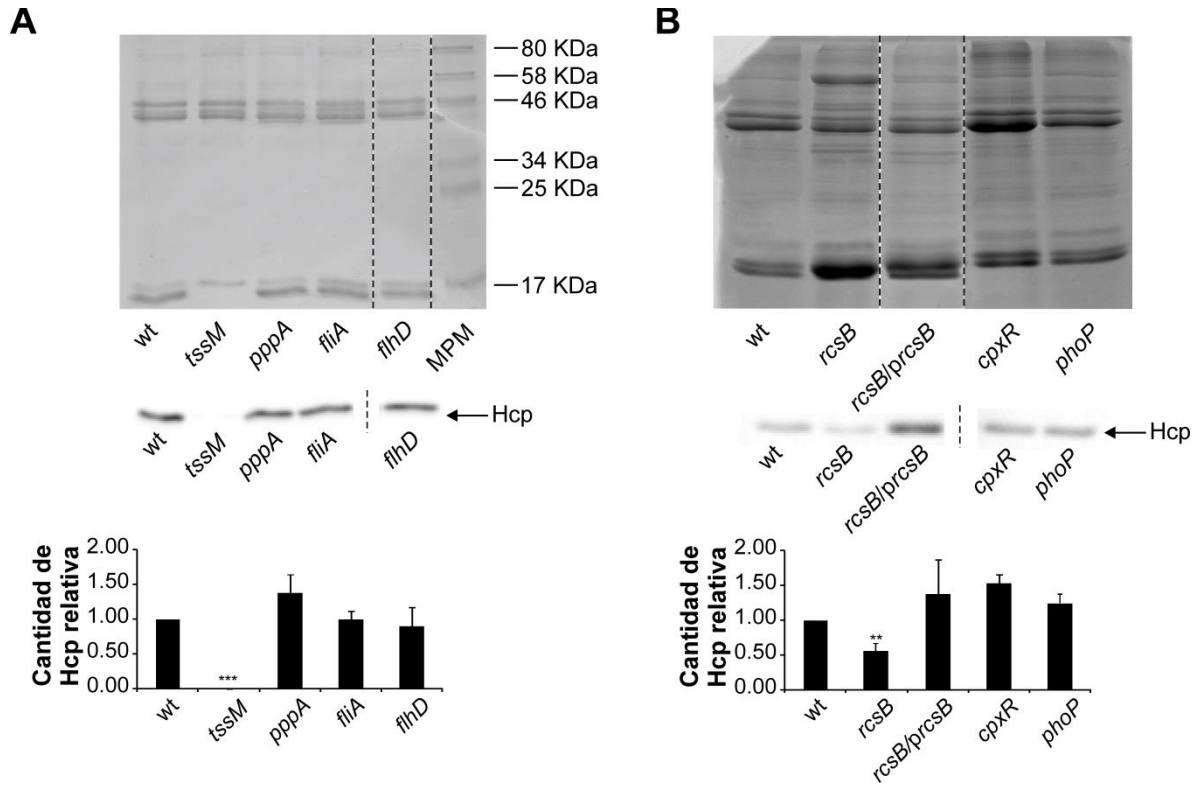


Figura IV.9. Búsqueda de factores regulatorios del SST6 mediante secreción de Hcp. Se cultivaron las cepas indicadas durante 16 h con agitación constante a 37°C. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron, concentraron por precipitación con TCA y resuspendieron en solución de siembra desnaturalizante. Las muestras se separaron mediante un SDS-PAGE al 15% y se realizó una transferencia y posterior inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-Hcp (panel medio). Un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga (panel superior). En la parte inferior de la figura se muestran los niveles de Hcp secretado cuantificados por densitometría y relativos al valor obtenido para la cepa silvestre. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. Se muestran imágenes representativas de los geles. Se cortaron distintas calles del mismo gel (indicado con líneas de puntos) para excluir otras cepas ensayadas. MPM: Marcador de peso molecular.

IV.2.5. Regulación del SST6 por parte del sistema Rcs

Como se mencionó en la introducción general, el sistema Rcs es un sistema regulador global complejo que integra diversas señales y regula muchos fenotipos. Brevemente, la quinasa de membrana interna RcsC puede autofosforilarse y transferir el fosfato a una proteína intermediaria, RcsD, que a su vez puede transferir el fosfato al regulador de respuesta RcsB. Éste puede formar homodímeros o heterodímeros y unirse a la región promotora de diversos genes blanco para activar o reprimir su transcripción. Es importante destacar que RcsC también tiene actividad fosfatasa y, por lo tanto, puede defosforilar a RcsB. La lipoproteína de membrana externa RcsF canaliza ciertas señales a RcsC, si bien es importante destacar que no siempre está involucrada en la detección y transducción de señales (201).

Con el objetivo de profundizar el estudio de la regulación del SST6 por parte del sistema Rcs, se ensayó la actividad transcripcional del reportero en cepas mutantes en los componentes del sistema Rcs. Para tal fin, se conjugó el plásmido reportero transcripcional ppromSST6 a distintas cepas mutantes y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por

GFP, normalizados por la DO_{600nm} luego de cultivar las bacterias durante 16 h a 37°C con agitación.

Como se puede observar en la Figura IV.10, el nivel de actividad transcripcional del reportero del SST6 obtenido para la mutante *rscF* presenta un valor similar al de la cepa silvestre, por lo tanto, la proteína RcsF no participaría en la detección de la señal en este proceso. En cambio, la mutante *rscC* presenta un nivel de actividad transcripcional del SST6 significativamente mayor que el obtenido para la cepa silvestre (Figura IV.10). Este resultado permite inferir que, en esta situación, RcsC está funcionando como fosfatasa y que es necesaria para defosforilar a RcsB y apagar el sistema. Por último, se ensayó la cepa mutante *wecG*. Trabajos previos del laboratorio han reportado que alteraciones en la estructura del ECA resultan en una activación del sistema Rcs (38). Por ende, cepas mutantes en los genes del *cluster wec*, que codifican para las enzimas de la vía de síntesis del ECA, pueden utilizarse para evaluar qué efectos tiene la activación del sistema Rcs. Como se puede observar en la Figura IV.10, el reportero transcripcional del SST6 presenta una actividad mayor en la mutante *wecG* que en la cepa silvestre. Por ende, se puede inferir que al encontrarse el sistema Rcs activo y como consecuencia RcsB fosforilado, aumentan los niveles transcripcionales del SST6. Este resultado es concordante con los resultados obtenidos para la mutante *rscB*.

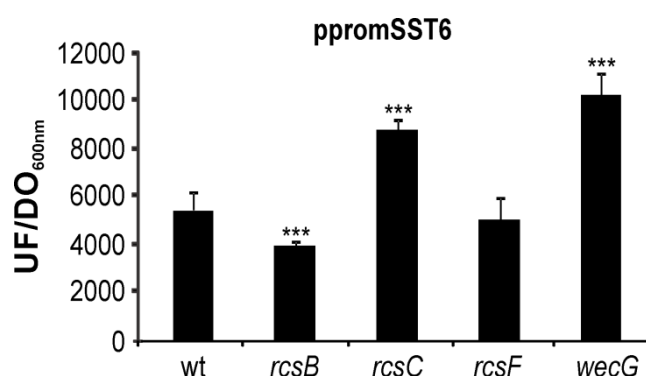


Figura IV.10. Análisis de la regulación del SST6 RcsB-dependiente utilizando el plásmido reportero transcripcional. Se cultivaron las cepas indicadas de *S. marcescens* RM66262 durante 16 h con agitación constante a 37°C. Las cepas contienen el plásmido reportero transcripcional *ppromSST6*. Se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP (UF) y la DO_{600nm} y se graficó la relación UF/DO_{600nm} . Se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos independientes (***) $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de Hcp secretado por las cepas ensayadas previamente. Para ello, se cultivaron las cepas indicadas durante 16 h a 37°C con agitación. Los sobrenadantes se concentraron por precipitación y las muestras se separaron mediante un SDS-PAGE. Luego se realizó una inmunodetección de Hcp y un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga.

En la Figura IV.11 se puede observar que las cepas mutantes en *rscC* y en *wecG* presentan mayores niveles de Hcp secretado que la cepa silvestre, indicando un SST6 más activo. El nivel de Hcp secretado por la cepa *rscF* no presenta diferencias significativas en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad transcripcional (Figura IV.10), ya que las cepas *rscC* y *wecG* tienen niveles de actividad transcripcional del SST6 mayores que la cepa silvestre. Por lo tanto, se puede reforzar la hipótesis postulada previamente y concluir que al estar RcsB en su

estado activado (por fosforilación en ausencia de RcsC, que actúa como fosfatasa, o por activación del sistema Rcs en las mutantes *wec*) aumentan los niveles transcripcionales del SST6 y esto permitiría una mayor actividad del SST6.

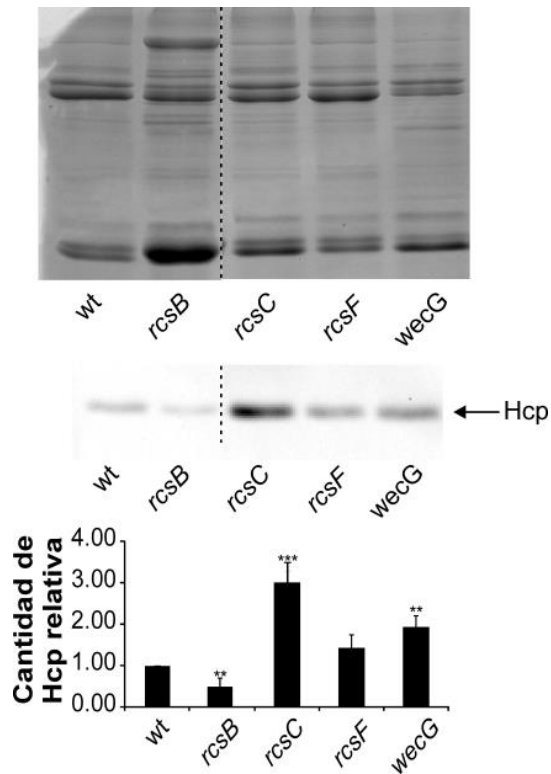


Figura IV.11. Análisis de la regulación del SST6 RcsB-dependiente mediante la secreción de Hcp. Se cultivaron las cepas indicadas durante 16 h con agitación constante a 37°C. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron, concentraron por precipitación con TCA y resuspendieron en solución de siembra desnaturizante. Las muestras se separaron mediante un SDS-PAGE al 15% y luego se realizó una transferencia y posterior inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-Hcp (panel medio). Un gel equivalente sembrado del mismo modo se tiñó con Coomassie como control de carga (panel superior). En la parte inferior de la figura se muestran los niveles de Hcp secretado cuantificados por densitometría y relativos al valor obtenido para la cepa silvestre. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. Se muestran imágenes representativas de los geles. Se cortaron distintas calles del mismo gel (indicado con líneas de puntos) para excluir otras cepas ensayadas. MPM: Marcador de peso molecular.

Por último, se realizaron ensayos de competencia interbacteriana con el fin de evaluar la capacidad antibacteriana de la mutante *rcsB*. Se realizó una co-incubación de la cepa atacante y la cepa presa (en relación 5:1) durante 4 h a 37°C y, posteriormente, se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. La cepa presa utilizada en este caso es *E. coli* MC4100. Recuperar un menor número de UFC de la bacteria presa respecto de la condición control indica una habilidad antibacteriana mayor de la cepa atacante. Como control se utilizó como atacante *E. coli* DH5 α , una cepa que, al igual que MC4100, no posee un SST6 codificado en su genoma.

En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad transcripcional y de secreción de Hcp, al ensayar la actividad antibacteriana de la cepa *rcsB*, la supervivencia de *E. coli* aumentó 288 veces en comparación con la obtenida para la cepa silvestre (Figura IV.12). Este fenotipo recuperó un nivel equivalente al obtenido para la cepa silvestre cuando la mutación se complementó en *trans* expresando el gen *rcsB* desde un plásmido (Figura IV.12). Por lo tanto, este resultado sugiere que RcsB regula la competencia interbacteriana por medio del SST6.

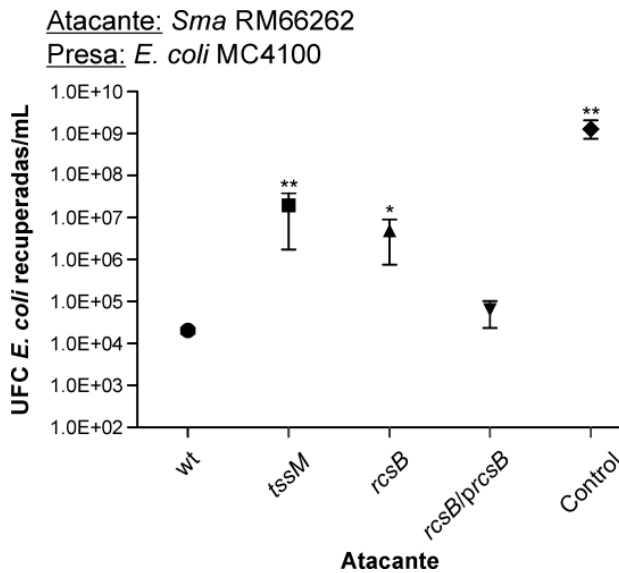


Figura IV.12. Análisis de la regulación del SST6 RcsB-dependiente utilizando ensayos de competencia interbacteriana. Las cepas indicadas de *S. marcescens* (*Sma*) RM66262 (atacantes) y *E. coli* MC4100 (presa) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. Se incubó *E. coli* DH5α con la presa como control. Se realizó un recuento de UFC de *E. coli* MC4100. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para cuatro ensayos independientes (* p<0,05 y ** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido al utilizar la cepa silvestre como atacante.

IV.2.6. Determinación de la interacción de RcsB con la región promotora del SST6

Utilizando los algoritmos de predicción de motivos MEME/MAST (193, 194), se detectó la presencia de un motivo putativo de unión a RcsB en la región promotora del *cluster* génico que codifica para los componentes del SST6 en la cepa *S. marcescens* RM66262 (examinando la región de 500 pb que se encuentra corriente arriba de *vgrG*). En primer lugar, a través del algoritmo de predicción de motivos MEME (193), se construyó el motivo consenso de unión a RcsB utilizando una serie de regiones promotoras que contienen secuencias de reconocimiento *bona-fide* para esta proteína. Posteriormente, a través del algoritmo MAST (194), se encontró un sitio putativo de unión a RcsB 418 pb corriente arriba del ATG que marca el sitio de inicio de la traducción de *vgrG*. Dicha secuencia mostró 12 de las 17 bases conservadas del logo obtenido (Figura IV.13).

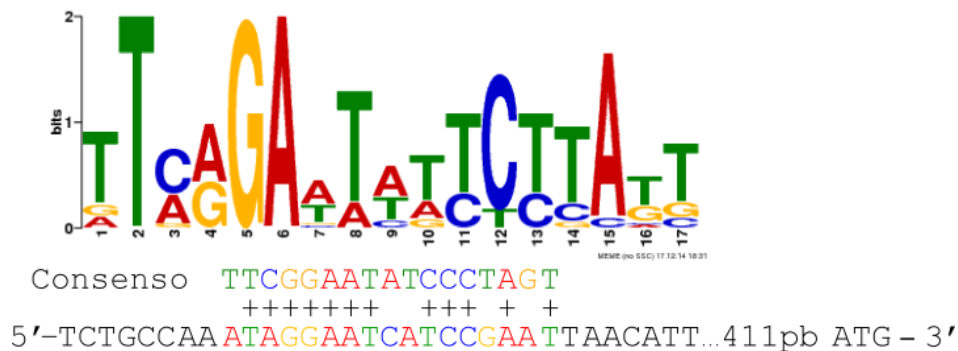


Figura IV.13. Análisis y detección *in silico* de una secuencia consenso de unión para RcsB. Se generó el motivo consenso de unión a RcsB utilizando el algoritmo MEME y las regiones promotoras de genes regulados por RcsB ya conocidos. Posteriormente, se utilizó la matriz obtenida para buscar motivos en la secuencia promotora del SST6 de *S. marcescens* RM66262 mediante el algoritmo MAST. Los residuos conservados están marcados con "+" en el alineamiento con la secuencia consenso.

Para examinar si la regulación de la expresión del *cluster* génico que codifica para los componentes del SST6 por parte de RcsB es directa o indirecta, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética utilizando un fragmento de ADN que comprende 500 pb corriente arriba de *vgrG* (primer gen del *cluster*) y la proteína RcsB purificada como fusión a

una cola de 6 Histidinas (RcsB-His6X). Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron corroborar que dicha fusión no afecta la actividad regulatoria de RcsB, ni la capacidad de unirse al ADN *in vitro*.

Como se puede observar en la Figura IV.14, existe un retardo en la movilidad electroforética del fragmento de ADN cuando se agregan al menos 22 pmoles de RcsB. Este resultado sugiere una interacción entre RcsB y la secuencia de ADN contenida en la sonda. Esta interacción es específica ya que, al competirla con una sonda con la misma secuencia de ADN sin marcar radioactivamente, se pierde la señal correspondiente a la formación del complejo RcsB-ADN (Figura IV.14A). Contrariamente, al adicionar una sonda que contiene una secuencia de ADN no marcada y que no presenta motivos de unión a RcsB, como competidor inespecífico, no se altera el retardo observado (Figura IV.14B). Este resultado demuestra que RcsB interacciona de forma directa y específica con la secuencia de ADN correspondiente a la región promotora del *cluster* génico del SST6.

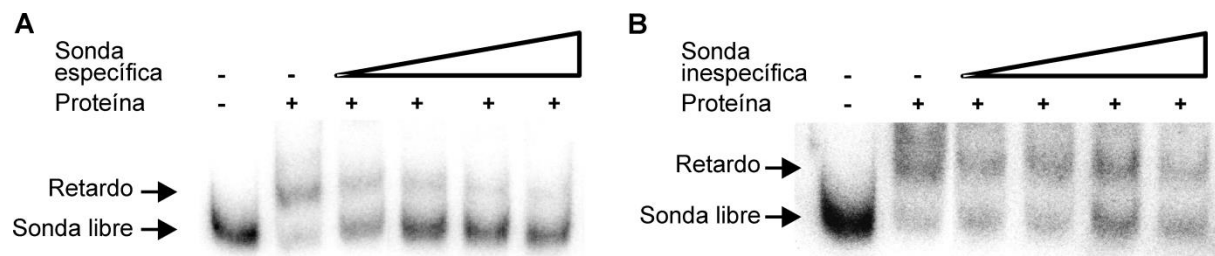


Figura IV.14. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética del ADN. Se amplificó el fragmento de ADN correspondiente a la región promotora del SST6 por PCR utilizando el oligonucleótido directo marcado radioactivamente con ^{32}P . Se incubaron aproximadamente 15 ng de esta sonda marcada con 22 pmoles de RcsB-6xHis purificada y fosforilada con acetilfosfato. A dicha mezcla de reacción se añadieron cantidades crecientes (80 ng, 160 ng, 240 ng y 320 ng) de sondas de ADN no radioactivo correspondientes al **A**) promotor del SST6 (sonda específica) o **B**) al promotor de *shIB* Δ cajaRcsB (sonda inespecífica). Se muestran imágenes representativas de los geles.

Para identificar el sitio de unión a RcsB y, de este modo, validar el motivo predicho *in silico*, se realizaron ensayos de protección a la ADNasa I, tanto en la hebra codificante como en la no codificante. Como se puede observar en la Figura IV.15, existe protección entre los nucleótidos -418 y -438 relativos al ATG que marca el sitio de inicio de la traducción de *vgrG*. Esta región protegida coincide con el motivo de unión a RcsB predicho bioinformáticamente (Figura IV.13). En conjunto, estos resultados demuestran que RcsB reconoce e interacciona específicamente con la secuencia de ADN que corresponde a la región promotora del *cluster* génico del SST6.

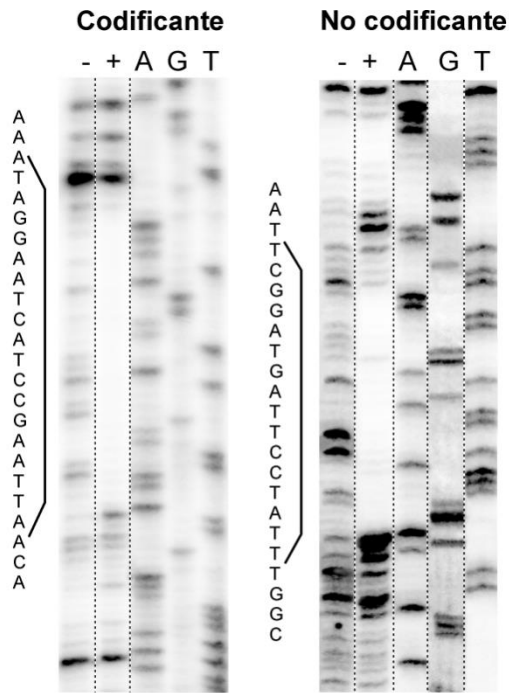


Figura IV.15. Ensayo de protección a la ADNasa I. El ensayo se realizó sobre las hebras codificantes y no codificantes de la sonda del promotor del *cluster* génico del SST6 marcada radioactivamente. Se agregaron 25 pmoles de RcsB fosforilado con acetilfosfato (+) o 0 pmoles (-) a la sonda. Se cortaron calles del mismo gel (indicado con líneas de puntos) para excluir las concentraciones de proteína no óptimas. En la parte inferior de la figura se indica una parte de la secuencia de la región promotora del *cluster* génico del SST6. La región marcada con línea entera representa la zona protegida por RcsB-6XHis en cada hebra, mientras que la superposición de ambas protecciones se indica con línea de puntos. La secuencia resaltada en negrita representa el motivo de unión a RcsB predicho *in silico*. Se muestran imágenes representativas de los geles.

5'-TCTGCCAA**AATAGGAATCATCCGAAT**TAACATT-3'
 3'-AGACGGTT**TATCCTTAGTAGGCTTA**ATTGTAA-5'

A continuación, se realizó un análisis *in silico* utilizando las regiones que se encuentran corriente arriba de *vgrG* en los genomas de *Serratia* disponibles en la base de datos NCBI. Se evaluaron los genomas de las cepas de *Serratia* que poseen sintenia en el *cluster* génico que codifica para el SST6 y en los cuales el primer gen del *cluster* es *vgrG*. Se observó que en la región promotora del *cluster* génico del SST6 de las diferentes cepas evaluadas se encuentra un motivo de unión a RcsB con un 100% de identidad de secuencia con la obtenida para nuestra cepa en estudio (Figura IV.16). También es importante destacar que, como se puede observar en la Figura IV.16, todos estos motivos se encuentran a una distancia similar del ATG de *vgrG* (aproximadamente 400 pb). Este resultado indica que la regulación observada no es exclusiva de *S. marcescens* RM66262 y que podría estar conservada dentro del género *Serratia*.

IV.2.7. Evaluación de la habilidad antibacteriana interespecífica de *S. marcescens* RM66262

Previamente, se reportó que el SST6 de *S. marcescens* Db10 tiene actividad antibacteriana, siendo capaz de eliminar a *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* y otras cepas de *S. marcescens* (101). Para evaluar si el aislamiento clínico *S. marcescens* RM66262 tiene capacidad de eliminar a otras bacterias, además de *E. coli*, se realizaron ensayos de competencia interespecífica, utilizando como presa a *S. enterica* serovar Typhimurium 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 o *Acinetobacter nosocomialis* M2. Con ese fin, se co-incubó a la cepa atacante (*S. marcescens* RM66262 silvestre o mutante *tssM*) con la cepa presa indicada en cada caso en

relación 5:1 a 37°C durante 4 h y posteriormente se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. Como control se usó como atacante *E. coli* DH5 α , una cepa que no posee un SST6 codificado en su genoma.

<i>Serratia marcescens</i> RM66262	CTGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> Db11	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 391 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> SM39	CTACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 391 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> CAV1492	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTCACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> B3R3	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> WW4	CGGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 413 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> RCS-14	AGGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 413 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CTGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> U363635	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 421 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> isolate PWN146	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> SMB2099	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia marcescens</i> AS1	CCACCAAATAGGAATCATCCGAATTCACAT... 412 pb ATG
<i>Serratia</i> sp. Fs14	CGGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 413 pb ATG
<i>Serratia</i> sp. SCBI	CGGCCAAATAGGAATCATCCGAATTAACAT... 413 pb ATG

Figura IV.16. Motivos de unión a RcsB en regiones promotoras de los clusters génicos del SST6 en *Serratia*. Se realizó un análisis *in silico* de las secuencias que se encuentran corriente arriba de *vgrG* en los genomas de *Serratia* depositados en la base de datos NCBI. Los números de acceso se indican en la sección III.13.3. El motivo de unión a RcsB se indica subrayado y a la derecha se indican los pares de bases que distan al ATG de *vgrG*.

Como se mencionó previamente, recuperar un menor número de UFC de la bacteria presa en comparación con el control indica una capacidad antibacteriana mayor de la cepa atacante. Se puede concluir que, en las condiciones ensayadas, *S. marcescens* RM66262 es capaz de eliminar de un modo dependiente de su SST6 a *E. aerogenes* ATCC13048, pero no a *S. enterica* serovar Typhimurium 14028, *A. baumannii* ATCC17978 y *A. nosocomialis* M2 (Figura IV.17).

IV.2.8. Análisis de la capacidad antibacteriana intraespecífica de *S. marcescens*

Como se mencionó en la introducción general, Gerc y colaboradores reportaron que el SST6 de *S. marcescens* Db10 tiene actividad antibacteriana, incluso cuando la cepa presa no tiene un SST6 funcional, lo que indicaría que dicho sistema tiene una función agresiva más que defensiva (108). En contraste, en *P. aeruginosa* se demostró que el SST6 es principalmente una defensa y es utilizado para atacar a bacterias que produjeron un ataque previo (97). Para examinar si el SST6 de *S. marcescens* RM66262 tiene una función agresiva o defensiva, se exploró la interacción intraespecífica. Para ello, se utilizaron las cepas de *S. marcescens* RM66262 y Db10 silvestres o mutantes como atacantes y presas en ensayos de competencia interbacteriana. La relación atacante:presa utilizada fue 5:1 y luego de una incubación de 6 h a 37°C se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. Como control se utilizó como atacante *E. coli* DH5 α .

Al ensayar la actividad antibacteriana de *S. marcescens* RM66262, se observa que la supervivencia de *S. marcescens* Db10 aumenta 57 veces al incubarla con *S. marcescens* RM66262 *tssM* en comparación con la cepa RM66262 silvestre (Figura IV.18A). Del mismo

modo, la supervivencia de *S. marcescens* RM66262 aumenta 105 veces al ser incubada con la cepa Db10 *tssM* en comparación con la cepa Db10 silvestre (Figura IV.18C). Por lo tanto, se puede concluir que ambas cepas de *S. marcescens* son capaces de eliminar a la otra cepa de un modo dependiente del SST6 de la atacante.

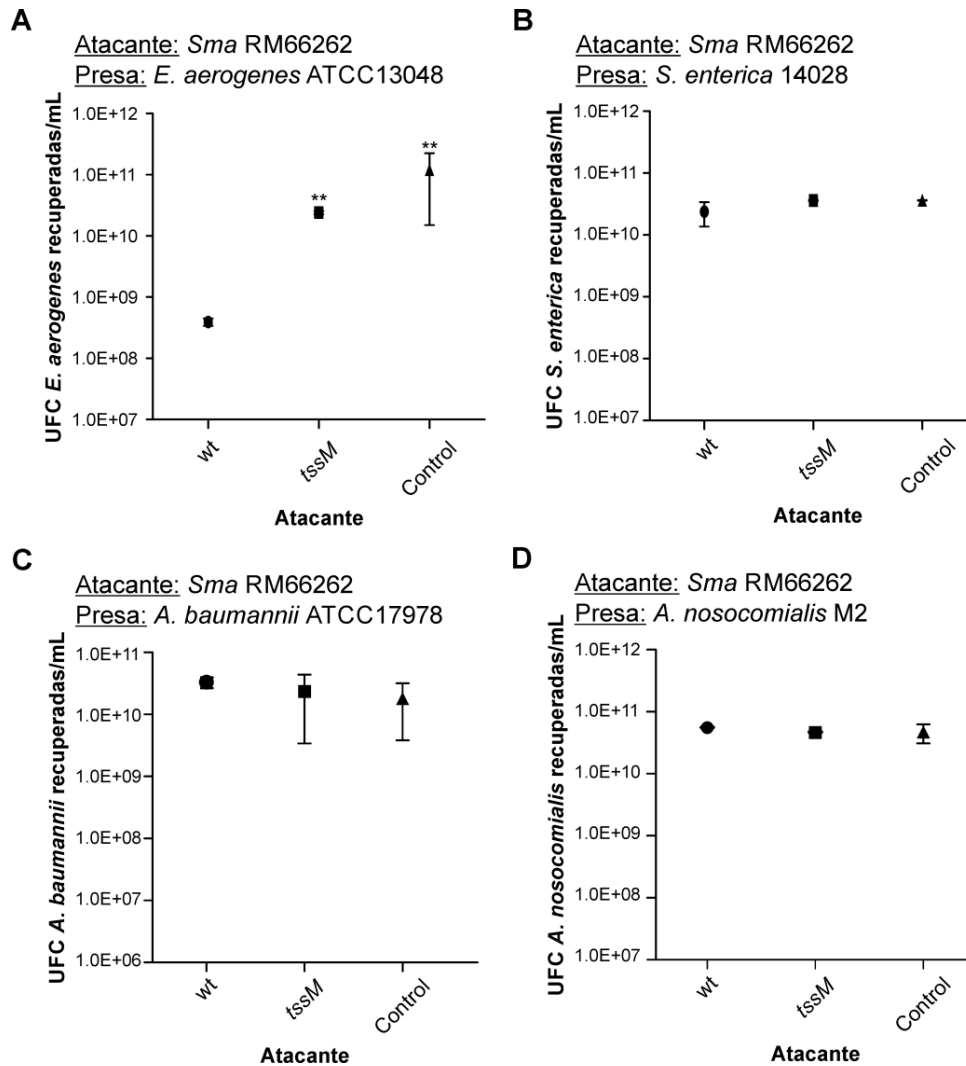


Figura IV.17. Análisis de la capacidad antibacteriana interespecífica de *S. marcescens* RM66262. Las cepas de *S. marcescens* (*Sma*) RM66262 silvestre o mutante *tssM* (atacantes) y las cepas indicadas como presas se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *E. coli* DH5α se co-incubó con las presas como control. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para cuatro ensayos independientes (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre.

En la Figura IV.18A también se puede observar que al ensayar la actividad antibacteriana de *S. marcescens* RM66262 *rscB*, la supervivencia de *S. marcescens* Db10 aumenta 46 veces en comparación con la cepa RM66262 silvestre. Este resultado es concordante con los resultados obtenidos en los ensayos de competencia interbacteriana utilizando *E. coli* como presa (Figura IV.12), en los cuales se concluyó que la capacidad antibacteriana de la cepa mutante en *rscB* es menor que la de la cepa silvestre.

Cuando se utilizó como presa una cepa que no posee un SST6 funcional, las cepas atacantes no son capaces de eliminar a sus presas (Figura IV.18B y C). En ambos casos (tanto cuando se utiliza la cepa RM66262 *tssM* o cepa Db10 *tssM* como presas), se obtiene el mismo

número de UFC al incubarlas con una atacante silvestre o mutante en *tssM*. Por lo tanto se puede concluir que la habilidad de eliminar a la otra cepa en condiciones de competencia intraespecífica es dependiente también de la funcionalidad del SST6 de la presa.

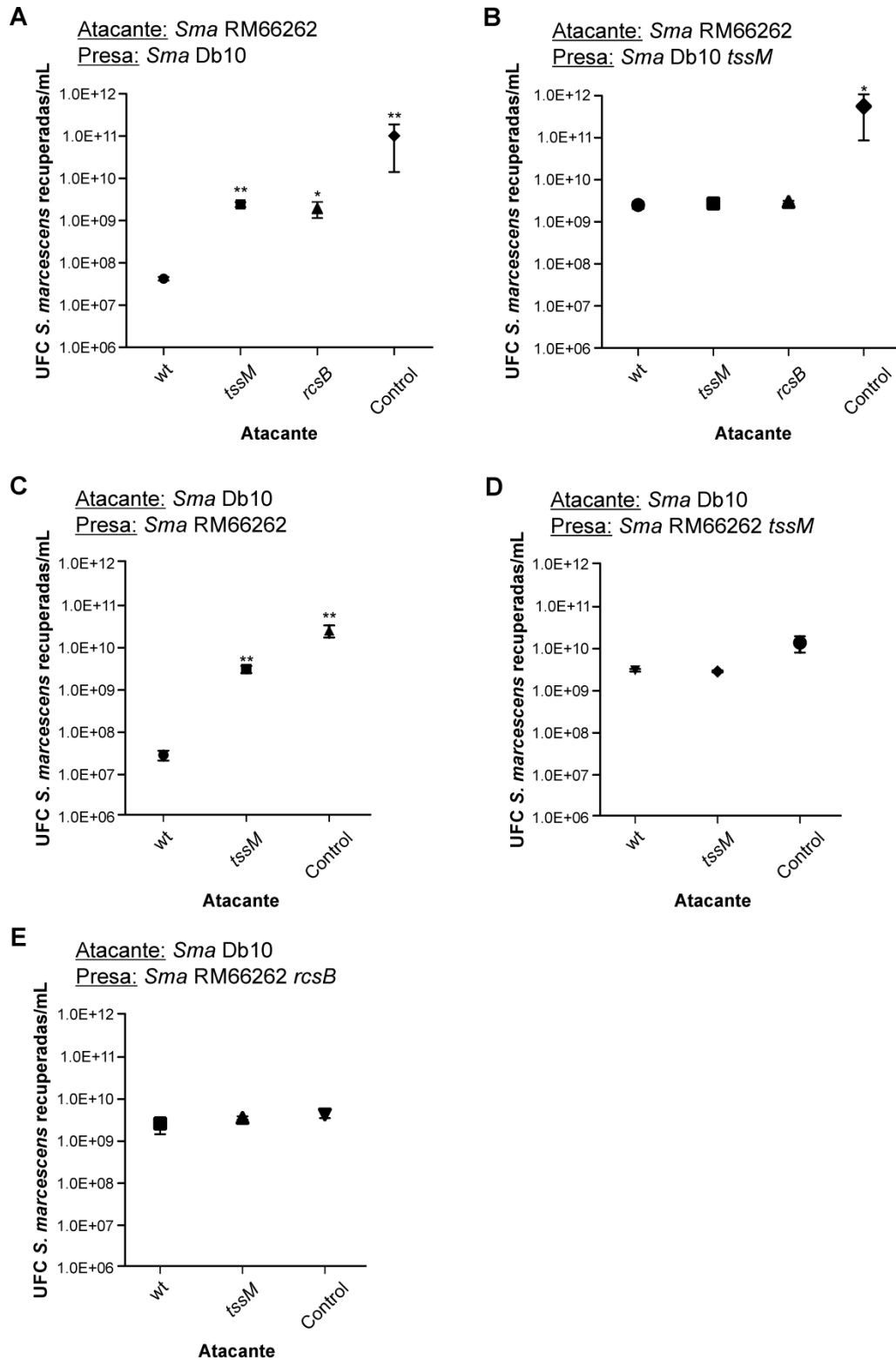


Figura IV.18. Evaluación de la habilidad antibacteriana intraespecífica de *S. marcescens* RM66262 y Db10. Las cepas de *S. marcescens* (*Sma*) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 6 h. *E. coli* DH5α fue co-incubada con las presas como control. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para tres ensayos independientes (* p<0,05 y ** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre.

Los resultados mostrados hasta el momento permiten formular un modelo en el cual *S. marcescens* RM66262 es capaz de eliminar a *S. marcescens* Db10, pero no puede hacerlo si la presa es deficiente en SST6. Y lo mismo sucede para *S. marcescens* Db10. Esto quiere decir que la habilidad de matar de los atacantes depende de la funcionalidad del SST6 de la presa. En este punto es importante destacar que las cepas de *S. marcescens* utilizadas para los ensayos poseen un alto porcentaje de identidad en varios de los genes que codifican para los efectores del SST6 y también para las proteínas de inmunidad asociadas (Figura IV.2). Es por ello que la actividad antibacteriana de *S. marcescens* RM66262 es mucho mayor al co-incubarla con *E. coli* que con *S. marcescens* Db10.

IV.2.9. Modulación transcripcional del SST6 en presencia de bacterias competidoras

Los ensayos mostrados previamente sugieren que la actividad antibacteriana de una cepa depende de si la presa posee un SST6 funcional. Para examinar si actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6 es dependiente de si se está realizando una co-incubación con una cepa que posee un SST6 funcional, se realizaron ensayos de competencia interbacteriana utilizando cepas que contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6 como presas o atacantes, según se indique en cada caso. Como se mencionó previamente, este vector contiene una fusión transcripcional del promotor del *cluster* génico del SST6 al gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP.

En primer lugar, se co-incubaron las cepas *S. marcescens* RM66262 indicadas (atacantes) con *E. coli* MC41000 (presa) durante 4 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). Las cepas atacantes contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Como control se utilizó *S. marcescens* RM66262 silvestre en ausencia de una presa. Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC de la bacteria atacante y medidas de intensidad de fluorescencia de GFP, para obtener la relación unidades de fluorescencia/UFC. Dicho valor fue normalizado al obtenido para la cepa *S. marcescens* RM66262 silvestre co-incubada con *E. coli*. Previamente, se corroboró que el fenotipo observado en la Figura IV.12 se conserva cuando las cepas empleadas como atacantes contienen el ppromSST6.

El nivel de expresión basal del SST6 detectado en las condiciones ensayadas es equivalente en presencia o en ausencia de una presa inocua (Figura IV.19, comparar barras wt con control). Este resultado indica que *Serratia* no presenta una inducción de la transcripción del *cluster* génico del SST6 al encontrarse con una presa no agresiva, en comparación a cuando se la incuba en ausencia de una presa. Esta expresión basal es dependiente de RcsB (Figura IV.19).

A continuación, se co-incubaron las cepas *S. marcescens* Db10 silvestre o mutante *tssM* (atacantes) con las cepas *S. marcescens* RM66262 silvestre o mutantes en los genes indicados (presas) durante 6 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). Como control se utilizó como atacante *E. coli* DH5 α . Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC de la

bacteria presa y medidas de intensidad de fluorescencia de GFP, para obtener la relación unidades de fluorescencia/UFC. Dicho valor fue normalizado considerando el valor obtenido para el control como la unidad. Previamente, se corroboró que el fenotipo observado en la Figura IV.18 se conserva cuando las cepas empleadas como presas contienen el ppromSST6.

Atacante: *Sma* RM66262

Presa: *E. coli* MC4100

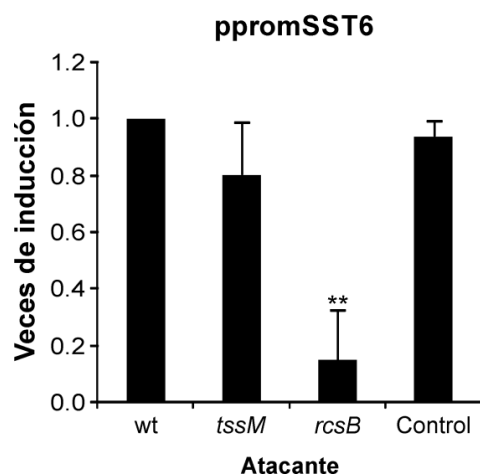


Figura IV.19. Ensayo de competencia con medida de actividad transcripcional en la cepa atacante. Las cepas indicadas de *S. marcescens* (*Sma*) RM66262 (atacantes) y *E. coli* MC4100 (presa) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *S. marcescens* RM66262 silvestre en ausencia de una presa se utilizó como control. Las cepas atacantes contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa atacante y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al valor obtenido al incubar la cepa silvestre con *E. coli*. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos independientes (** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido al incubar la cepa silvestre con *E. coli*.

El nivel transcripcional del promotor del *cluster* génico del SST6 aumenta 197 veces cuando se incuba *S. marcescens* RM66262 silvestre con *S. marcescens* Db10 silvestre, en comparación con el nivel obtenido en el control (Figura IV.20, panel izquierdo). En contraposición, al co-incubar dicha presa con *S. marcescens* Db10 *tssM* no se observa inducción transcripcional (Figura IV.20, panel izquierdo). La inducción transcripcional tampoco es observada cuando las cepas presas son *S. marcescens* RM66262 *rcsB* ni *S. marcescens* RM66262 *tssM* (Figura IV.20, paneles central y derecho). Este resultado sugiere que, en una situación de competencia intraespecífica, la transcripción del *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens* es activada de un modo dependiente de RcsB, en respuesta a un ataque. Por el contrario, si no existe un ataque (en el caso de la cepa *tssM* como presa o como atacante) no hay activación transcripcional del *cluster* génico del SST6.

Los resultados mostrados previamente demuestran que, en la competencia intraespecífica *Serratia* vs *Serratia*, la inducción de la transcripción del *cluster* génico del SST6 de la presa es dependiente de RcsB y ocurre sólo cuando tanto la cepa presa como la atacante tienen un SST6 funcional. Para comprender el mecanismo regulatorio que predomina en una competencia interespecífica, se utilizó como atacante *A. baumannii* ATCC17978. La expresión del SST6 de *A. baumannii* ATCC17978 está regulado negativamente por un plásmido que se pierde espontáneamente en parte de la población (182); por ende para los ensayos siguientes se utilizaron las cepas sin el plásmido represor, es decir que expresan constitutivamente el SST6. Se realizaron ensayos de competencia interbacteriana incubando las cepas indicadas de *S. marcescens* RM66262 y *A. baumannii* ATCC17978, como atacantes y presas, durante 4 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). Posteriormente, se realizó un recuento de UFC de la

cepa presa. En paralelo, se realizó un ensayo de actividad transcripcional en competencia interespecífica utilizando como presa *S. marcescens* RM66262 conteniendo el plásmido reportero transcripcional ppromSST6, en las condiciones indicadas previamente. Se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP y se normalizó el valor obtenido por las UFC de la cepa presa. En todos los casos, los controles se realizaron utilizando *E. coli* DH5α como atacante.

Atacante: *Sma* Db10

Presa: *Sma* RM66262

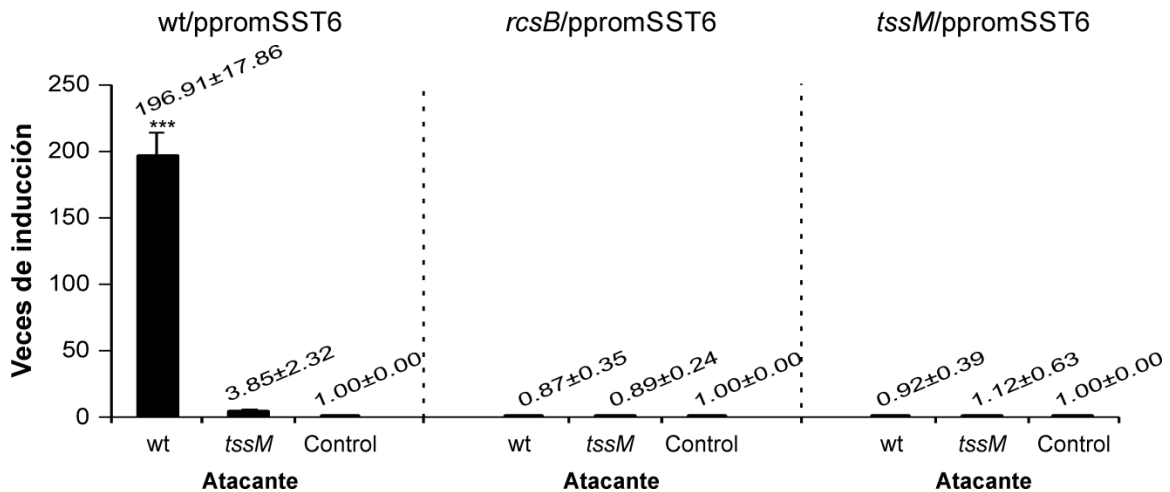


Figura IV.20. Ensayos de competencia intraespecífica con medida de actividad transcripcional. Las cepas de *S. marcescens* (*Sma*, atacantes y presas) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 6 h. *E. coli* DH5α se co-incubó con las presas como control. Las cepas presas contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al control correspondiente. En el gráfico se muestran los promedios ± S.D. para tres ensayos independientes (***) $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido en el control correspondiente.

En la Figura IV.21A se puede observar que *A. baumannii* ATCC17978 silvestre es capaz de eliminar a *S. marcescens* RM66262 de un modo dependiente de su SST6, ya que la supervivencia de *Serratia* aumenta 200 veces al ser incubada con *A. baumannii tssM* (con un SST6 no funcional) en comparación con *A. baumannii* silvestre. *S. marcescens* RM66262 no es capaz de eliminar a *A. baumannii* ATCC17978 (Figura IV.21B), incluso en una situación en la cual *A. baumannii* no posee un SST6 funcional (Figura IV.21C).

Para examinar si existe inducción de la expresión del *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens* RM66262 en respuesta a *A. baumannii*, se utilizó el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de competencia intraespecífica, la competencia contra *A. baumannii* silvestre causa una inducción transcripcional de 363 veces en comparación con el control (Figura IV.21D, panel izquierdo). Esta inducción es dependiente de la presencia de un SST6 en la cepa atacante, ya que *A. baumannii tssM* fue incapaz de inducir la transcripción del *cluster* génico del SST6 de la presa. Para evaluar si la inducción observada es dependiente de RcsB (como sucede en el caso de la competencia intraespecífica), se utilizó como presa la cepa *S. marcescens* RM66262 *rscB*. La mutación en *rscB* redujo la inducción transcripcional en un 69% al ser comparada con la cepa

silvestre (Figura IV.21D, panel central), demostrando que en la competencia interespecífica la activación de la expresión del *cluster* génico del SST6 de la presa también es dependiente de RcsB. Esta inducción es independiente del SST6 de la presa, ya que tanto una mutante en *tssM* (con un SST6 no funcional) como *S. marcescens* silvestre presentan una inducción equivalente como consecuencia del ataque de *Acinetobacter* (Figura IV.21D, panel derecho). Estos resultados demuestran que *A. baumannii* ATCC17978 es capaz de eliminar a *Serratia* y de inducir la expresión del *cluster* génico del SST6 de un modo dependiente de RcsB e independiente del SST6 de la presa. Es importante destacar que, en este caso, cuando se utiliza como presa una mutante *rscB* hay una inducción remanente que es independiente de RcsB y que estaría respondiendo a un mecanismo aún desconocido.

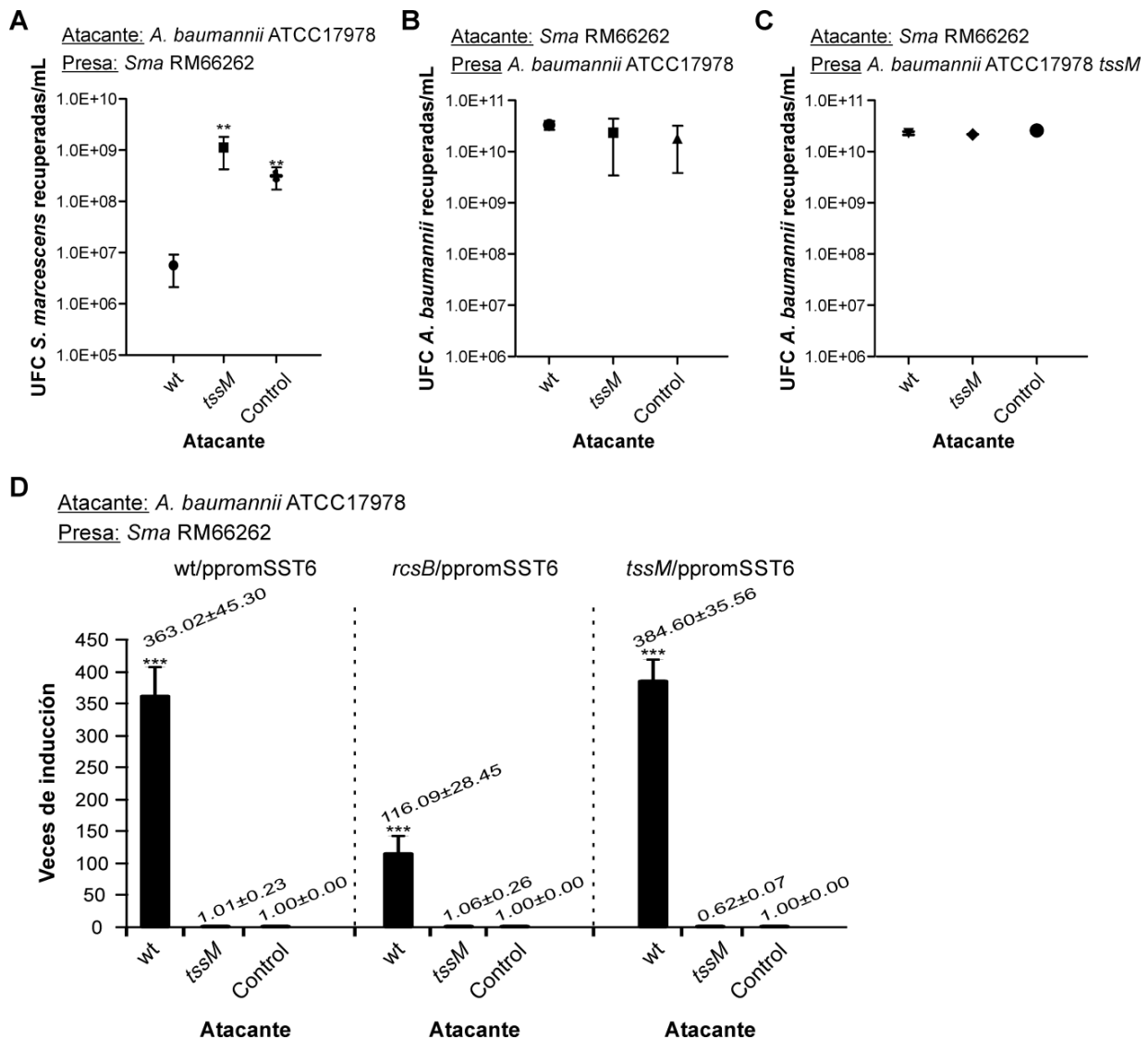


Figura IV.21. Ensayos de competencia interespecífica *A. baumannii* vs *Serratia*. Las cepas de *A. baumannii* ATCC17978 y de *S. marcescens* (*Sma*) RM66262 se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *E. coli* DH5α se co-incubó con las presas como control. **A-C)** Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para cuatro ensayos independientes (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. **D)** Las cepas presas contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al control correspondiente. En el gráfico se muestran los promedios ± S.D. para cuatro ensayos independientes (***) p<0,001). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para el control correspondiente.

Para verificar que los fenotipos observados no están restringidos a la interacción entre una única especie de *Acinetobacter* y *Serratia*, se realizaron los ensayos mencionados previamente utilizando la cepa *A. nosocomialis* M2 como atacante. Con ese fin, se co-incubaron las cepas *A. nosocomialis* M2 silvestre o mutantes estructurales en SST6 (*tssB* o *tssD*, atacantes) con las cepas *S. marcescens* RM66262 silvestre o mutantes en los genes indicados (presas) durante 4 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En paralelo, se realizó un ensayo de actividad transcripcional en competencia utilizando como presa *S. marcescens* RM66262 conteniendo el plásmido reportero transcripcional ppromSST6 en las condiciones indicadas previamente. Se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP y se normalizó el valor obtenido por las UFC de la cepa presa.

En la Figura IV.22A se puede observar que *A. nosocomialis* M2 silvestre es capaz de eliminar a *S. marcescens* RM66262 de un modo dependiente de su SST6, ya que la supervivencia de *Serratia* aumenta 5 órdenes de magnitud al ser incubada con *A. nosocomialis* *tssB* o *tssD* (con un SST6 no funcional) en comparación con *A. nosocomialis* silvestre. Al evaluar la inducción del reportero transcripcional, se observa que al incubar *S. marcescens* silvestre con una atacante agresiva (*A. nosocomialis* silvestre) se induce aproximadamente 1200 veces al compararla con el control o las cepas mutantes en SST6 (Figura IV.22B, panel izquierdo). Esta inducción es dependiente de RcsB, ya que la mutante *rscB* presenta una inducción mucho menor que la cepa silvestre (Figura IV.22B, panel derecho). Como fue observado en la competencia contra *A. baumannii*, la cepa mutante *rscB* presenta una inducción transcripcional remanente que es independiente de RcsB y que estaría sujeta a una regulación aún desconocida.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten concluir que se induce la transcripción del *cluster* génico del SST6 cuando *S. marcescens* RM66262 se encuentra con una bacteria que posee un SST6 funcional. Esta inducción es dependiente del regulador de respuesta RcsB e independiente del SST6 de la presa. Los resultados presentados hasta el momento indican que *Serratia* posee un nivel basal de actividad del SST6, que le permite eliminar bacterias inocuas, pero al encontrarse con una atacante agresiva, se induce la transcripción del *cluster* génico del SST6. Es decir que la regulación dependiente de RcsB funcionaría como un mecanismo de defensa.

IV.2.10. Evaluación de la direccionalidad del contraataque inducido por la presencia de bacterias competidoras

Como se mencionó previamente, *P. aeruginosa* presenta un comportamiento inducido por interacciones interbacterianas denominado “duelo”. Este comportamiento afecta fuertemente la habilidad de *P. aeruginosa* de atacar a otras especies bacterianas de forma dependiente de su SST6 y sólo sucede si la presa tiene un SST6 funcional. El ensamblado del

SST6 y el contraataque, que posteriormente produce la eliminación de la presa, son regulados por una señal producida en el sitio del ataque de la otra bacteria. Es importante destacar que esta respuesta post-traducciona induce el contraataque sólo contra la bacteria que atacó previamente a *Pseudomonas*, es decir que el contraataque es direccionado (97).

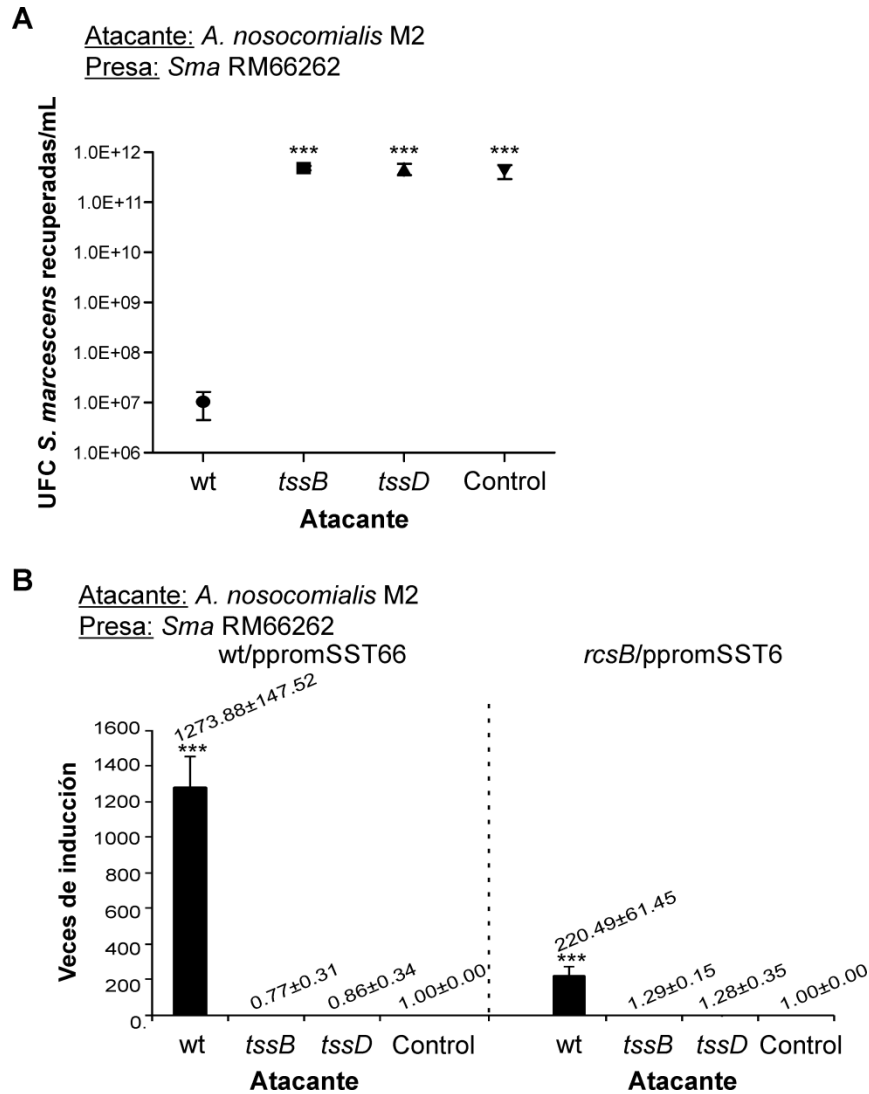


Figura IV.22. Ensayos de competencia interespecífica *A. nosocomialis* vs *Serratia*. Las cepas de *A. nosocomialis* M2 silvestre o mutantes (atacantes) y las cepas indicadas como presas se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *E. coli* DH5 α se co-incubó con las presas como control. **A)** Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.E.M. para cuatro ensayos independientes (***) $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. **B)** Las cepas presas contienen el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al control correspondiente. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.D. para cuatro ensayos independientes (***) $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control correspondiente.

Para evaluar si el contraataque de *S. marcescens* RM66262 es direccionado, se examinó si el estímulo detectado por una *Serratia* que posee un SST6 funcional en un encuentro con otra *Serratia* que también posee un SST6 funcional es suficiente para permitir que la primer cepa mencionada pueda eliminar a otra cepa que no posee un SST6 (y por lo tanto que no sería detectada). Para ello, se realizaron ensayos de competencia tripartita co-

incubando *S. marcescens* RM66262 silvestre o mutante *tssM* (atacantes) con *S. marcescens* Db10 silvestre (presa agresiva) y mutante *tssM* (presa inocua) en relación 10:1:1 (atacante:presa agresiva:presa inocua) durante 6 h a 37°C. El control se realizó utilizando como atacante la cepa *E. coli* DH5 α . Posteriormente, se realizó un recuento de UFC de ambas presas, seleccionándolas gracias a distintas resistencias a antibióticos. Es importante recordar que *S. marcescens* RM66262 no posee la capacidad de eliminar a *S. marcescens* Db10 *tssM* (Figura IV.18B). Sin embargo, cuando *S. marcescens* RM66262 silvestre (atacante) se co-incuba con *S. marcescens* Db10 silvestre (presa agresiva), la cepa atacante adquiere la capacidad de eliminar a *S. marcescens* Db10 *tssM* (presa inocua), ya que se recuperan menos UFC de ambas presas en comparación con la condición control (Figura IV.23A).

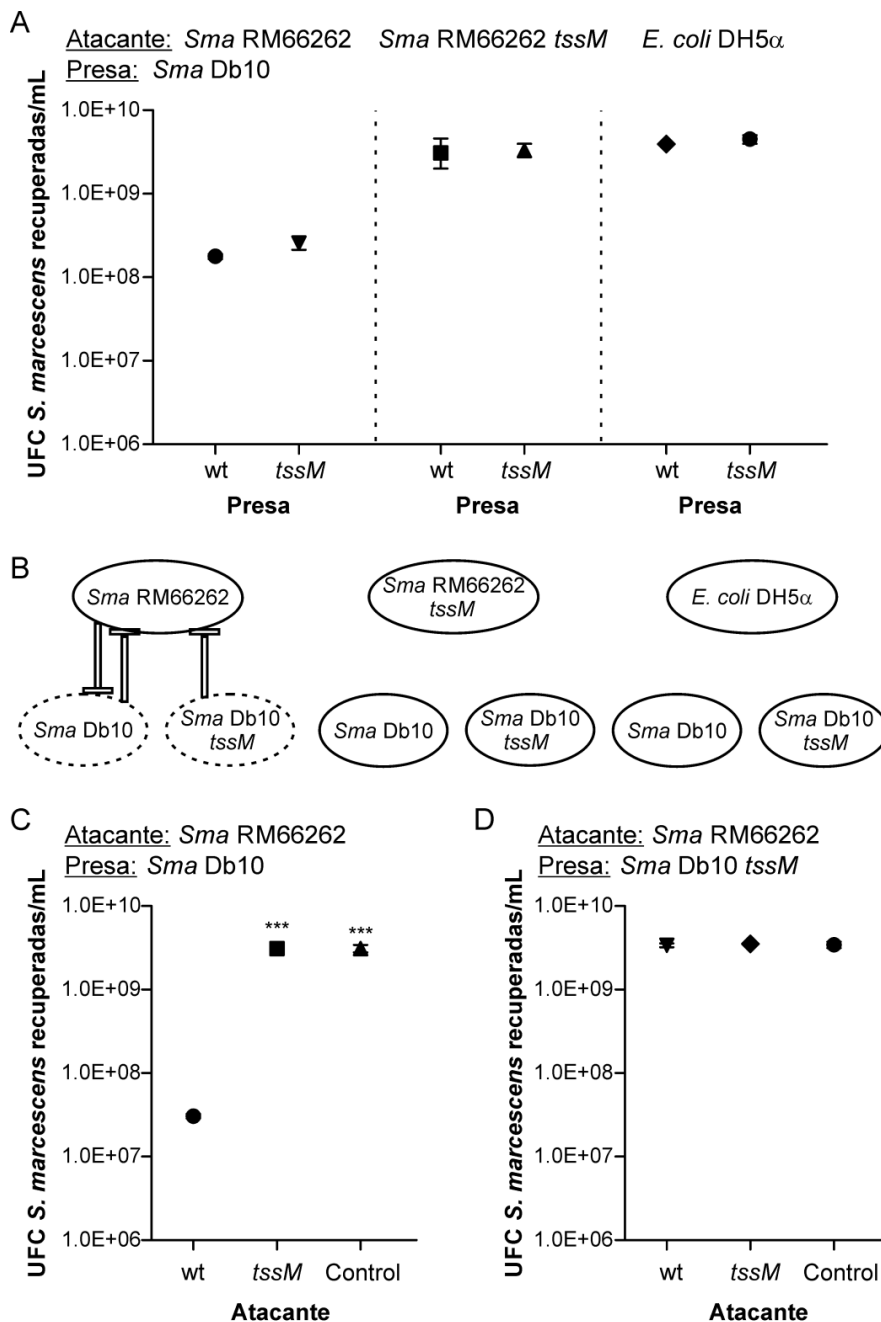


Figura IV.23. Ensayos de competencia intraespecífica tripartita. Las cepas de *S. marcescens* (*Sma*, atacantes y presas) se co-incubaron a 37°C durante 6 h en relación **A)** 10:1:1 (atacante:presa agresiva:presa inocua) o **C-D)** en relación 10:1 (atacante:presa). *E. coli* DH5 α se co-incubó con las presas como control. Se realizó un recuento

de UFC de la o las cepas presa. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.E.M. para tres ensayos independientes (***) $p < 0,001$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. **B)** El esquema indica las interacciones bacterianas ensayadas en la parte A de la figura.

Adicionalmente, se realizaron los controles necesarios para verificar que al modificar la relación atacante:presa, *S. marcescens* RM66262 es capaz de eliminar a *S. marcescens* Db10 y aún es incapaz de eliminar a *S. marcescens* Db10 *tssM* (Figura IV.23C y D). Con estos resultados, se puede concluir que una vez que la transcripción del *cluster* génico del SST6 es inducida por el encuentro con una bacteria que posee un SST6 funcional, *Serratia* está habilitada para eliminar bacterias que no poseen un SST6. Este resultado indica que *S. marcescens* no lleva a cabo un contraataque direccionado y preferencial sobre la bacteria que produjo su inducción transcripcional. Este mecanismo es distinto al reportado para *Pseudomonas* (97) y ayudaría a *Serratia* a sobrevivir en un nicho polimicrobiano.

IV.2.11. Búsqueda de la señal inductora de la transcripción del SST6

Con el objetivo de encontrar la señal inductora de la transcripción del *cluster* génico del SST6 de *Serratia*, se plantearon varias hipótesis. La inducción transcripcional observada previamente podría ser resultado de: A) la perturbación de membrana ocasionada por la co-incubación con una cepa que posee un SST6 funcional, B) la liberación de un componente a partir de la eliminación de una sub-población de *Serratia*, C) el daño general a la envoltura o D) el daño ocasionado específicamente por los efectores translocados por el SST6.

Para evaluar la hipótesis A, se utilizaron distintas cepas de *A. baumannii* en ensayos de competencia interbacteriana. El SST6 de *A. baumannii* ha sido estudiado en detalle y se ha demostrado que en su genoma hay 4 genes que codifican para proteínas VgrG y sus putativos efectores asociados. Se reportó que VgrG1 tiene un rol esencial en la secreción de Hcp y, por ende, es un componente necesario para un SST6 funcional. VgrG2 y VgrG3 son requeridos para la secreción de Tde (putativa nucleasa) y Tse (proteína efectora sin homología conocida hasta el momento), respectivamente, y dichos efectores son esenciales para eliminar a *E. coli*. En contraposición, se observó que VgrG4 y su efector asociado Tae (putativa amidasa) son dispensables para la eliminación de *E. coli* (183). Con el fin de examinar la hipótesis A, se co-incubaron las cepas *A. baumannii* ATCC17978 silvestre o mutantes simples, dobles y triples en los genes *vgrG* (atacantes) con *S. marcescens* RM66262 silvestre (presa) durante 4 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). La cepa presa contiene el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Luego de la incubación, se realizó un recuento de UFC de la bacteria presa y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de GFP, para obtener la relación unidades de intensidad de fluorescencia/UFC. Dicho valor fue normalizado al obtenido para el control. El control se realizó utilizando *E. coli* DH5 α como atacante.

Como se puede observar en la Figura IV.24A, mientras que VgrG4 es dispensable, VgrG2 y VgrG3 son necesarios simultáneamente para que *A. baumannii* elimine a *S. marcescens*. En correlación con este resultado, sólo la cepa silvestre y la mutante *vgrG4*

pueden inducir la actividad del reportero transcripcional (Figura IV.24B). Es importante destacar que las simples mutantes *vgrG2* y *vgrG3*, las mutantes doble *vgrG2,3*, *vgrG2,4* y *vgrG3,4* y la mutante triple *vgrG2,3,4* poseen un SST6 ensamblado y funcional pero no pueden secretar los efectores asociados a las proteínas VgrG mutadas. Dichas cepas son incapaces de inducir la transcripción del reportero del SST6. En conjunto, estos resultados demuestran que es necesaria la acción simultánea de los efectores asociados a VgrG2 y VgrG3 para eliminar a *Serratia* y para activar la transcripción del *cluster* génico del SST6. Por lo tanto, se descarta la posibilidad de que la perturbación de membrana producida por el encuentro con una bacteria que posee un SST6 funcional sea suficiente para inducir la transcripción del *cluster* génico del SST6 de *Serratia*.

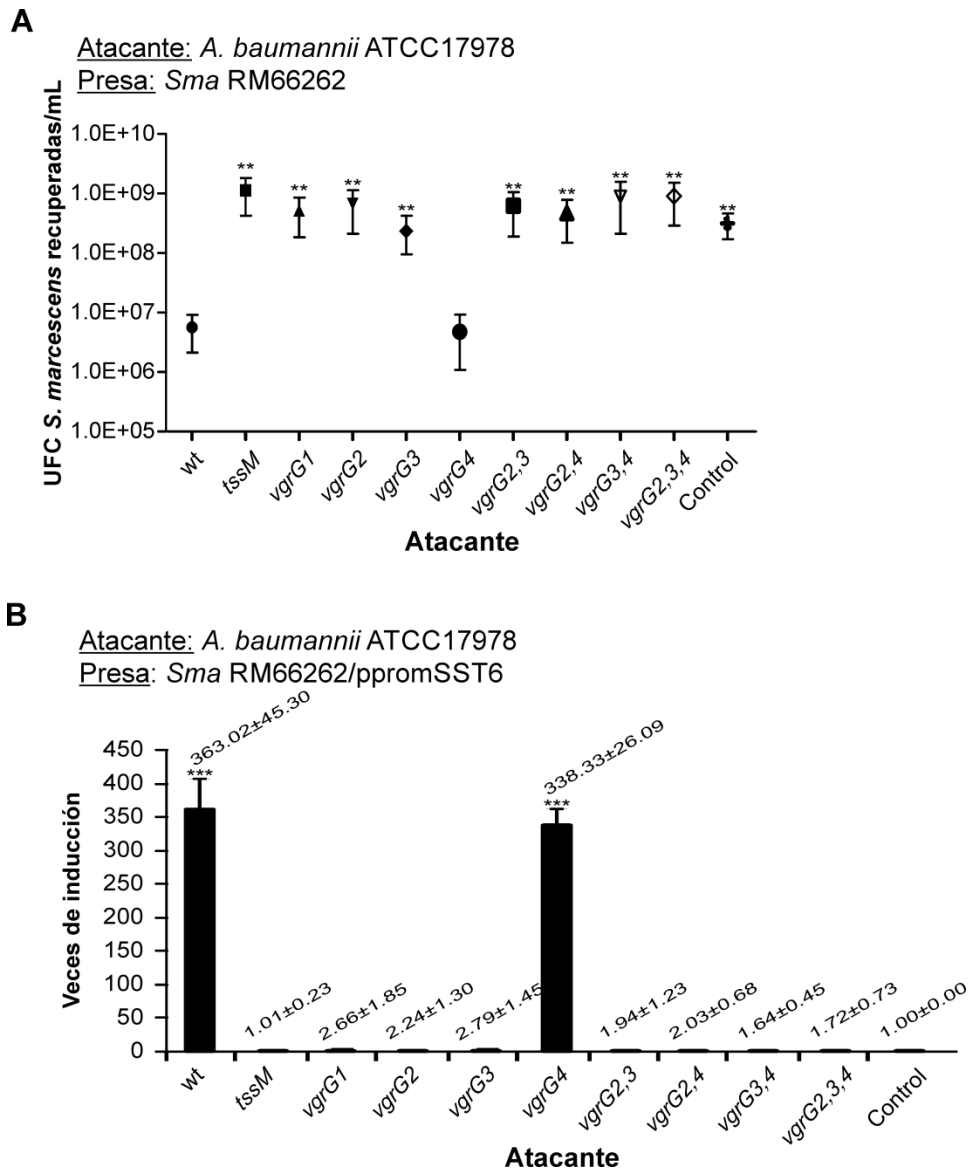


Figura IV.24. Ensayos de competencia interespecífica *A. baumannii* vs *Serratia*. Las cepas de *A. baumannii* ATCC17978 silvestre (wt) o mutantes (atacantes) y *S. marcescens* RM66262 como presa se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *E. coli* DH5α se co-incubó con la presa como control. **A)** Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para cuatro ensayos independientes (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. **B)** La cepa presa contiene el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al control. En el gráfico se muestran los promedios ± S.D. para cuatro ensayos independientes (***) p<0,001). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido

para el control.

La hipótesis B está sustentada por un trabajo reciente en el que demuestran que, en *P. aeruginosa*, el lisado de una célula hermana contiene señales que pueden ser detectadas por la presa y activando de forma post-transcripcional el SST6 (100). Para examinar dicha hipótesis se examinaron 4 posibilidades. En primer lugar, se incubaron distintos volúmenes de un lisado total de la cepa *S. marcescens* RM66262 silvestre o PBS, como control, con la cepa reportera *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm} . Como se puede observar en la Figura IV.25A, no se observaron modificaciones en los niveles de actividad del reportero transcripcional del SST6 frente al tratamiento.

Posteriormente, se planteó la hipótesis de que la señal detectada sólo es producida en condiciones de competencia interbacteriana. Con el propósito de obtener los productos liberados en dicha situación, se realizó un ensayo de competencia entre *A. baumannii* silvestre y *S. marcescens* RM66262, se colectó el sobrenadante libre de bacteria y se lo co-incubó con la cepa que lleva el reportero transcripcional ppromSST6. En la Figura IV.25B se puede observar que no hay modificaciones en la actividad del reportero transcripcional al comparar con los niveles obtenidos utilizando un sobrenadante proveniente de una condición de muerte (*A. baumannii* silvestre como atacante) con uno de no muerte (*A. baumannii tssM* como atacante).

A continuación, se propuso realizar un ensayo de difusión. Dicho ensayo es una competencia interbacteriana utilizando *A. nosocomialis* M2 o *E. coli* MC4100 como atacantes y *S. marcescens* RM66262 como presa. Encima de la competencia, se agregó un filtro donde se sembró la cepa reportera *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 y luego de la incubación, se colectaron las bacterias reporteras y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP, normalizados por la DO_{600nm} . En la Figura IV.25C hay un esquema del ensayo realizado y los niveles de actividad del reportero transcripcional obtenidos fueron equivalentes en todas las condiciones.

Por último, se realizó un ensayo de competencia tripartita usando una atacante (*S. marcescens* Db10 silvestre o *tssM*), una presa (*S. marcescens* RM66262 o *E. coli* MC4100) y una cepa reportera (*S. marcescens* RM66262 *tssM*/ppromSST6). El objetivo de este ensayo es tener componentes liberados *in situ* luego de la eliminación ocasionada por la competencia interbacteriana, tanto por presas de la misma especie como de otras. Con ese fin, se co-incubaron las cepas atacante, presa y reportera durante 6 h a 37°C en relación 5:1:1 (atacante:presa:reportera). Luego de la incubación, se recuperaron las bacterias y se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de GFP obtenida en las distintas condiciones ensayadas (Figura IV.25D).

En conjunto, los resultados mostrados hasta el momento evidencian que las moléculas

liberadas por lisis mecánica o por la eliminación de *S. marcescens* en un ensayo de competencia interbacteriana no inducen la actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6 de *Serratia*.

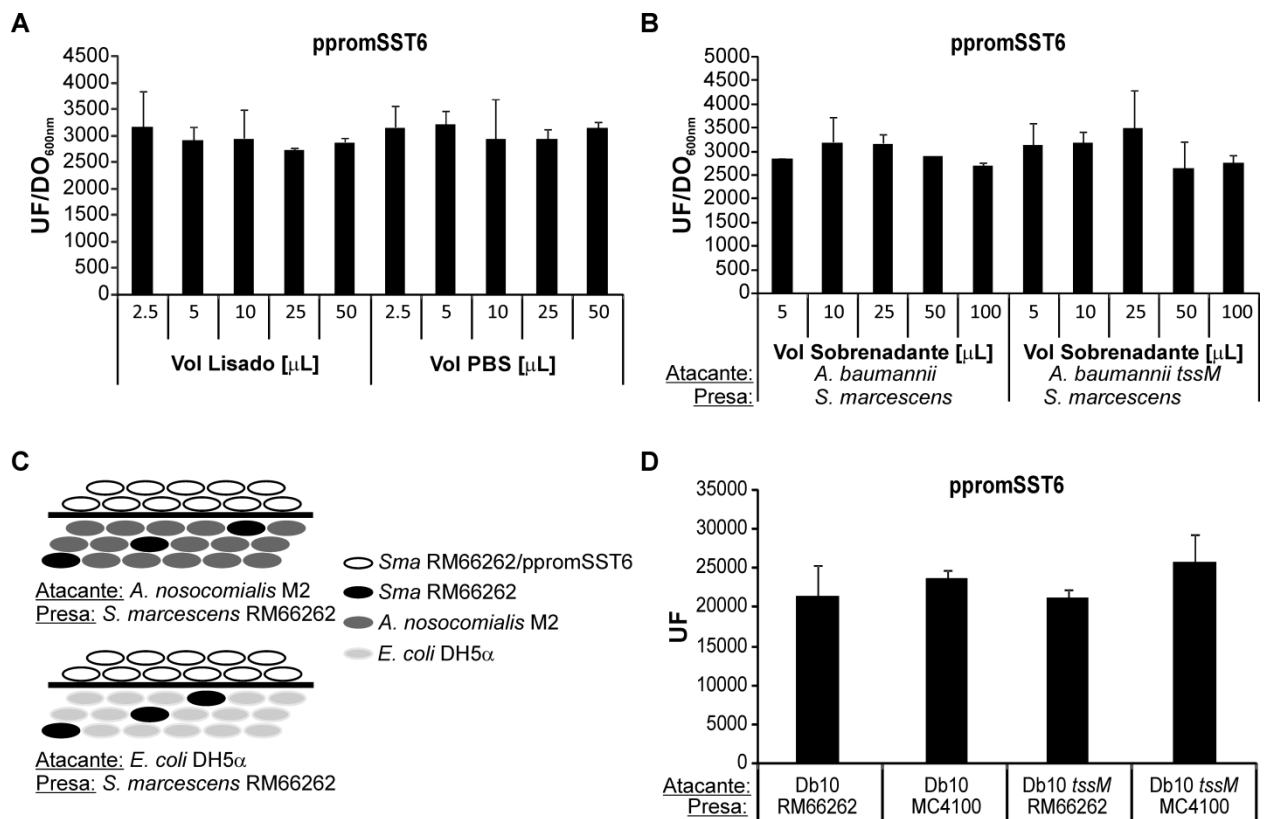


Figura IV.25. Ensayos de actividad transcripcional con productos derivados de la lisis bacteriana o de la eliminación bacteriana provocada por SST6. A) Se mezclaron diferentes volúmenes de lisado de *S. marcescens* RM66262 o PBS como control con la cepa reportera *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 y la mezcla se incubó 4 h en medio sólido. Posteriormente, las bacterias se recuperaron y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF) y la DO_{600nm}, para obtener la relación UF/DO_{600nm}. Se muestra el promedio ± S.D. para tres ensayos independientes. **B)** Se co-incubó *A. baumannii* ATCC17978 silvestre o mutante *tssM* con *S. marcescens* RM66262 en una relación 5:1 (atacante:presa) por 4 h a 37°C. Posteriormente, se recuperaron las células y se separó el sobrenadante libre de bacteria. Se mezcló la cepa reportera *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 con diferentes volúmenes de sobrenadante y se incubó la mezcla a 37°C en medio sólido. Luego de 4 h, se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF) y la DO_{600nm}, para obtener la relación UF/DO_{600nm}. Se muestra el promedio ± S.D. para tres ensayos independientes. **C)** Se co-incubó *A. nosocomialis* M2 o *E. coli* DH5α con *S. marcescens* RM66262 en una relación 5:1 (atacante:presa). Encima de la competencia de colocó un filtro donde se sembró *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 como se muestra en la figura. Luego de una incubación de 4 h a 37°C, se recuperaron las bacterias que estaban sobre el filtro y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF) y la DO_{600nm}, para obtener la relación UF/DO_{600nm}. **D)** Se co-incubó *S. marcescens* Db10 silvestre o mutante *tssM* con *S. marcescens* RM66262 o *E. coli* MC4100 y *S. marcescens* RM66262 *tssM*/ppromSST6 en una relación 5:1:1 (atacante:presa:reportera) durante 6 h a 37°C. Se midió intensidad de fluorescencia de GFP (UF). Se muestra el promedio ± S.D. para tres ensayos independientes.

A continuación y considerando que el sistema Rcs es un sistema de respuesta a estrés de envoltura, se analizó si la acción de agentes que dañan la envoltura bacteriana produce una inducción de la transcripción del *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens*. En primer lugar, se determinaron las concentraciones sub-letales de polimixina B, deoxicolato de sodio y SDS y, posteriormente, se incubó *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 con dichas concentraciones. El tratamiento con los agentes utilizados no produjo una modificación en la actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6 (Figura IV.26A).

Para verificar que los agentes ensayados produjeron perturbaciones en la envoltura de

Serratia, se midió actividad de la β -lactamasa (periplásmica; para medir daño a membrana externa) y β -galactosidasa (citoplásmica; para medir daño a membrana interna), utilizando nitrocefina y ONPG como sustratos, respectivamente. En la Figura IV.26B-D, se puede observar que los compuestos son activos a las concentraciones ensayadas y que perturban la integridad de membrana de *S. marcescens* RM66262. Este resultado indica que el daño a envoltura no específico no es suficiente para inducir la actividad del reportero transcripcional.

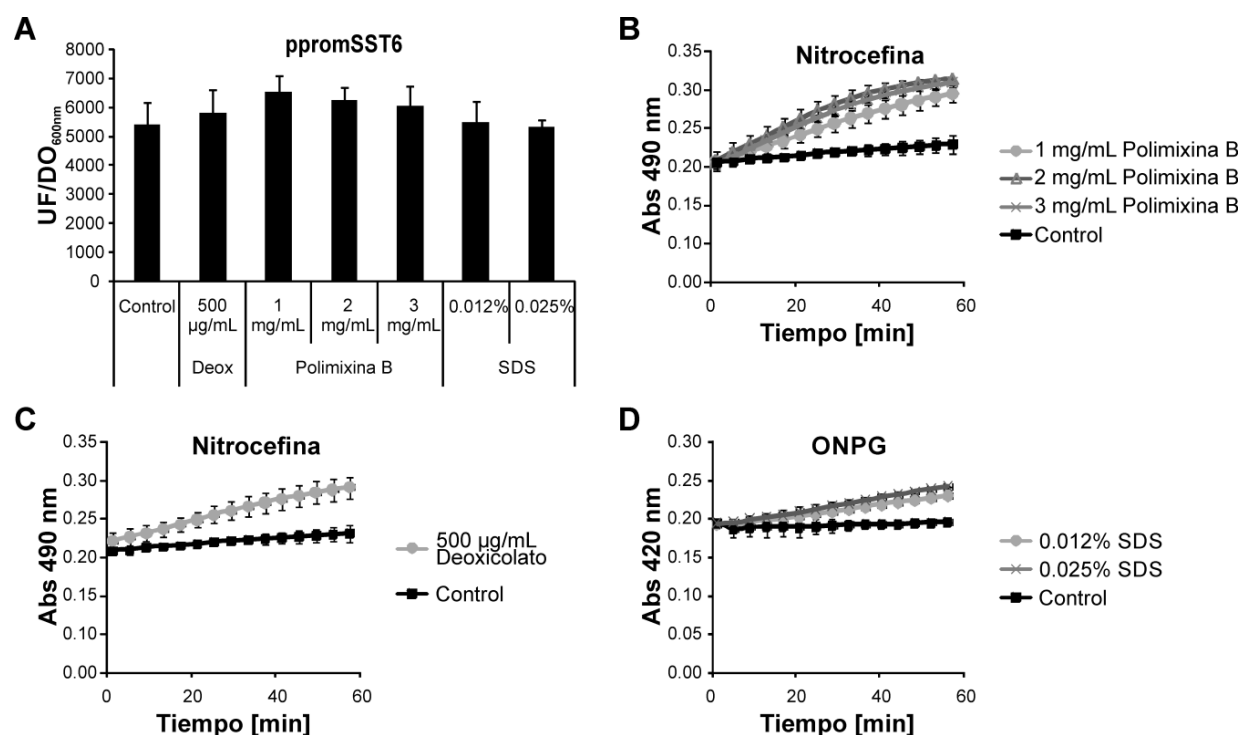


Figura IV.26. Ensayos de actividad transcripcional en presencia de agentes que causan daño a la envoltura bacteriana. **A)** Se cultivó *S. marcescens* RM66262/ppromSST6 en LB suplementado con SDS, deoxicolato de sodio (Deox) o polimixina B a las concentraciones indicadas durante 16 h a 37°C con agitación. Se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF) y la DO_{600nm}, para obtener la relación UF/DO_{600nm}. Se muestra el promedio \pm S.D. para tres ensayos independientes. **B y C)** Se cultivó *S. marcescens* RM66262 en LB suplementado con **B)** polimixina B o **C)** deoxicolato de sodio a las concentraciones indicadas durante 16 h a 37°C con agitación. Se diluyeron los cultivos y se agregó nitrocefina. Se realizaron medidas de absorbancia a 490 nm cada 4 min durante 60 min. Se muestra el promedio \pm S.D. para tres ensayos independientes. **D)** Se cultivó *S. marcescens* RM66262 en LB suplementado con SDS a las concentraciones indicadas 16 h a 37°C con agitación. Se diluyeron los cultivos y se agregó ONPG. Se realizaron medidas de absorbancia a 420 nm cada 4 min durante 60 min. Se muestra el promedio \pm S.D. para tres ensayos independientes.

La última hipótesis planteada es que el daño ocasionado específicamente por efectores translocados por el SST6 es la señal que induce actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6. Para ensayar dicha hipótesis, se examinó el efecto de utilizar como atacante una cepa defectiva en *tse3*, el efector asociado a VgrG3 en *A. baumannii* ATCC17978. Se realizaron ensayos de competencia incubando las cepas indicadas de *A. baumannii* ATCC17978 como atacantes y *S. marcescens* RM66262 como presa, durante 4 h a 37°C en relación 5:1 (atacante:presa). Posteriormente, se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En paralelo, se realizó un ensayo de actividad transcripcional en competencia interespecífica utilizando como presa *S. marcescens* RM66262 conteniendo el plásmido reportero ppromSST6, en las condiciones indicadas previamente. Se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP y

se normalizó el valor obtenido por las UFC de la cepa presa. Se realizaron los controles utilizando *E. coli* DH5α como atacante.

Previamente, se demostró que es necesaria la acción concertada de VgrG2 y VgrG3 (o sus efectores asociados) para que *A. baumannii* sea capaz de eliminar a *Serratia* e inducir la transcripción del *cluster* génico del SST6 (Figura IV.24). En concordancia dichos resultados, Tse3 (el efector asociado a VgrG3) es necesario para que *A. baumannii* pueda eliminar a *Serratia* e inducir la actividad del reportero transcripcional (Figura IV.27). Este resultado refuerza la hipótesis de que la translocación de efectores al citoplasma/periplasma de *Serratia* y/o la acción de los mismos es responsable de la activación transcripcional del *cluster* génico del SST6.

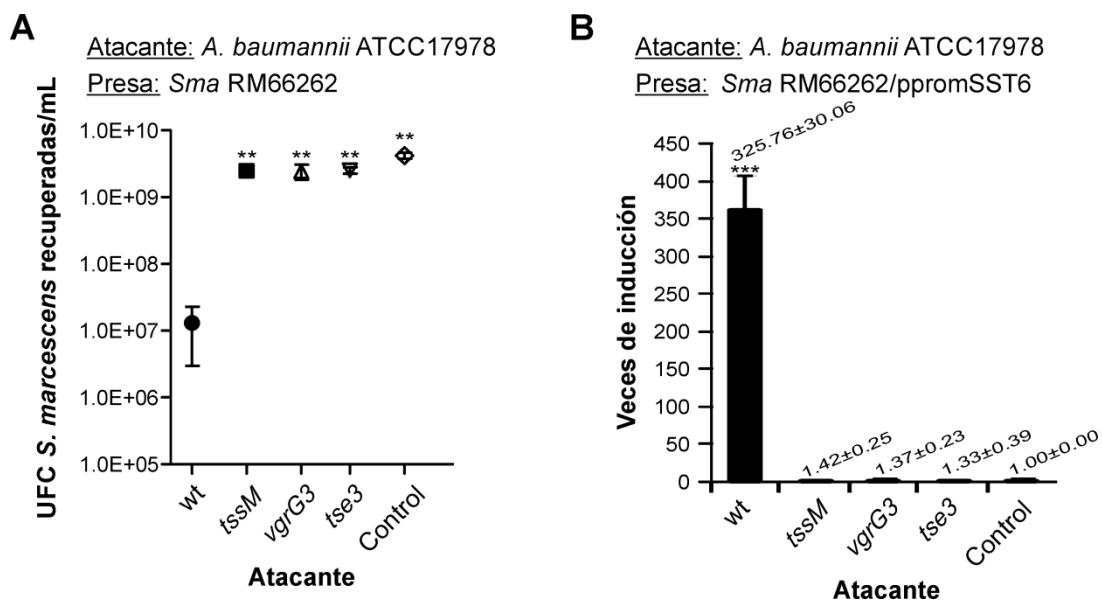


Figura IV.27. Ensayos de competencia interespecífica *A. baumannii* vs *Serratia*. Las cepas de *A. baumannii* ATCC17978 silvestre o mutantes (atacantes) y *S. marcescens* RM66262 (presa) se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. *E. coli* DH5α se co-incubó con las presas como control. **A)** Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios ± S.E.M. para tres ensayos independientes (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre. **B)** La cepa presa contiene el plásmido reportero transcripcional ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto al control correspondiente. En el gráfico se muestran los promedios ± S.D. para tres ensayos independientes (***) p<0,001). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para el control.

Es importante destacar la correlación que existe entre la capacidad de eliminar a la presa y los niveles de inducción del reportero transcripcional obtenidos. Mientras que en los ensayos de competencia intraespecífica se obtiene un nivel de eliminación leve, la inducción transcripcional también lo es (Figura IV.18 y Figura IV.20). En contraste, cuando *S. marcescens* está co-incubada con *A. baumannii* ATCC17978 hay un nivel de eliminación mayor y consecuentemente la inducción del reportero es mayor (Figura IV.21). Más aún, en el caso de la competencia contra *A. nosocomialis*, cuando la disminución en las UFC recuperadas de la presa es mayor que en los otros casos, se observó la mayor inducción de la transcripción del *cluster* del SST6 de la presa (Figura IV.22). Por lo tanto, se propuso indagar si dicha correlación se mantiene utilizando bacterias de otras especies como atacantes. Para ello se

realizaron ensayos de competencia interbacteriana utilizando las cepas indicadas como atacantes y *S. marcescens* RM66262 como presa en una relación 5:1 (atacante:presa). Dichas cepas se co-incubaron durante 4 h a 37°C y luego se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En paralelo, se realizó un ensayo de actividad transcripcional en competencia utilizando como presa *S. marcescens* RM66262 conteniendo el plásmido reportero ppromSST6, en las condiciones indicadas previamente. Se midieron los niveles de fluorescencia emitida por GFP y se normalizó el valor obtenido por las UFC de la cepa presa.

Las cepas atacantes ensayadas fueron las siguientes: *A. baumannii* 1225, *A. baylyi* ADP1, *A. baumannii* AbCA1, *P. aeruginosa* PAO1 y *V. cholerae* V52. Para cada una de estas especies se utilizó una cepa con un SST6 activo y una que no posee un SST6 funcional. La cepa *A. baumannii* AbCA1 sólo posee un SST6 activo si no posee el plásmido represor (p- no posee el plásmido represor, p+ posee el plásmido represor). En el caso de *A. baumannii* 1225, se utilizó una cepa con un SST6 funcional y activo (SST6+) y una que no posee un SST6 funcional (SST6-) (Mario Feldman, comunicación personal). Como control de las cepas *A. baylyi* ADP1 y *V. cholerae* V52, se usaron mutantes en *tssM* que no poseen un SST6 funcional. Se reportó que *P. aeruginosa* PAO1 posee 3 SST6 y que sólo el SST6-H1 es necesario para la eliminación bacteriana. La mutante ensayada en este caso es *icmF1*, mutante estructural del SST6-H1. También se reportó que dicha cepa sólo utiliza el SST6 como defensa y que en ausencia de un ataque el sistema está apagado. Sin embargo, la mutante *retS* tiene el SST6-1 activo constitutivamente (185).

Como puede ser observado en la Figura IV.28A, las UFC recuperadas de *Serratia* son menores al ser co-incubada con *A. baumannii* 1225 SST6+, *A. baumannii* AbCA1 p- y *V. cholerae* V52 silvestre que con las mismas cepas que no poseen un SST6 activo (*A. baumannii* 1225 SST6-, *A. baumannii* AbCA1 p+ y *V. cholerae* V52 *tssM*, respectivamente). Por lo tanto se puede concluir que *A. baumannii* 1225, *A. baumannii* AbCA1 y *V. cholerae* V52 tienen la capacidad de eliminar a *S. marcescens* de un modo dependiente del SST6. Dichas cepas también tienen la capacidad de inducir el reportero transcripcional del SST6 (Figura IV.28B). La cepa *A. baylyi* ADP1 no posee la capacidad de eliminar a *Serratia* y *P. aeruginosa* PAO1 tampoco, inclusive en la condición mutante *retS* en la que posee el SST6 activo constitutivamente (Figura IV.28A). Estas cepas tampoco producen una inducción del reportero transcripcional del SST6 (Figura IV.28B).

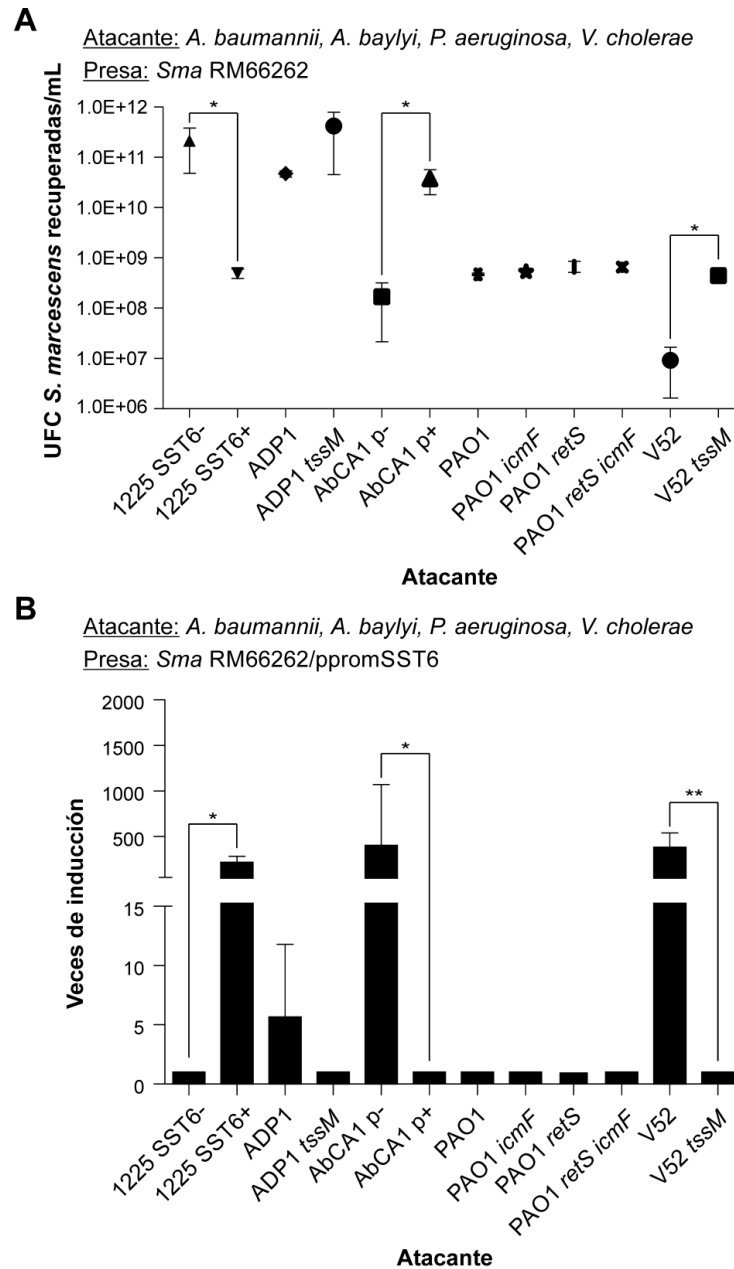


Figura IV.28. Ensayos de competencia interespecífica. Las cepas de *A. baumannii* 1255 y AbCA1 (p- no posee el plásmido represor, p+ posee el plásmido represor), *A. baylyi* ADP1, *P. aeruginosa* PAO1 y *V. cholerae* V52 silvestre o mutantes (atacantes) y *S. marcescens* RM66262 como presa se co-incubaron en relación 5:1 (atacante:presa) a 37°C durante 4 h. **A**) Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.E.M. para tres ensayos independientes (* $p < 0,05$). **B**) La cepa presa contiene el plásmido reportero ppromSST6. Se realizó un recuento de UFC de la cepa presa y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF), para obtener la relación UF/UFC. Se calcularon las veces de inducción respecto a la cepa atacante que no posee un SST6 activo, en cada caso. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$).

En resumen, si se comparan los niveles de inducción transcripcional del SST6 y los órdenes de eliminación (relativos a la condición de atacante con un SST6 no funcional), se puede observar que hay una tendencia en la cual al haber mayor eliminación bacteriana, hay mayor inducción transcripcional del SST6 (Figura IV.29).

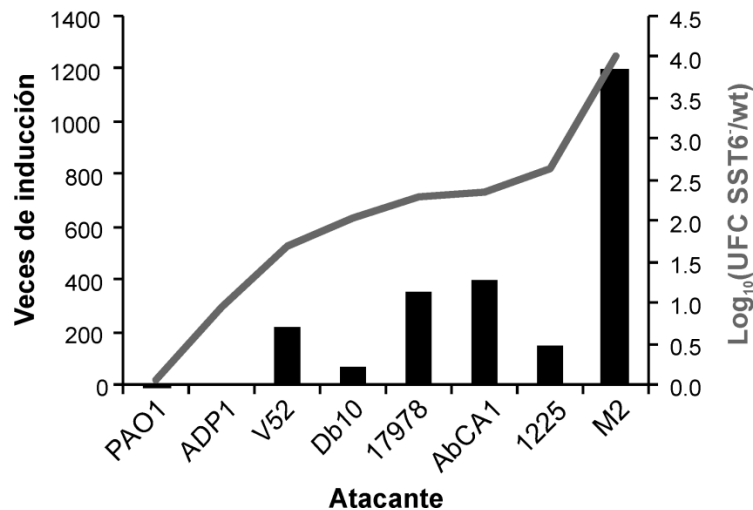


Figura IV.29. Gráfico comparativo: veces de inducción del reportero transcripcional del SST6 y órdenes de eliminación bacteriana (relativos a la condición en la que la cepa atacante no posee un SST6 funcional). Se ensayaron las cepas *S. marcescens* Db10, *A. baumannii* ATCC17978, *A. baumannii* 1255, *A. baumannii* AbCA1, *A. baylyi* ADP1, *A. nosocomialis* M2, *P. aeruginosa* PAO1 y *V. cholerae* V52. Las veces de inducción se muestran como barras negras y los órdenes de eliminación como la curva gris.

IV.2.12. Relevancia del SST6 en la invasión y la replicación intracelular en células CHO

Considerando que se reportó que el SST6 de algunos patógenos actúa directamente como un factor de virulencia (202–204), se propuso explorar su rol en la patogénesis de *S. marcescens*. Para ello, se realizaron ensayos protección a kanamicina en células CHO con las mutantes en los genes *tssM* y *pppA* que, como se mencionó anteriormente, codifican para uno de los componentes estructurales del complejo de membrana y para una fosfatasa que regula de forma post-traduccional el ensamblado del sistema, respectivamente.

En la Figura IV.30 se puede observar que el número de bacterias intracelulares recuperadas es equivalente para la cepa silvestre y las mutantes en el SST6, a cada tiempo. Por lo tanto, se puede concluir que el SST6 no tiene un efecto sobre los procesos de invasión y replicación en el modelo de células epiteliales CHO. Este resultado concuerda con lo publicado previamente por Murdoch y colaboradores, quienes propusieron que el rol biológico del SST6 de *S. marcescens* es antibacteriano y no antieucariota, ya que las mutantes en SST6 no presentan un fenotipo detectable en los modelos de virulencia *C. elegans*, *G. mellonella* y *D. discoideum* (101). Sin embargo, es importante destacar que el SST6 tiene un efecto indirecto sobre la virulencia de *Serratia* ya que le permite competir con otras bacterias para colonizar nichos intra o extra-hospedador.

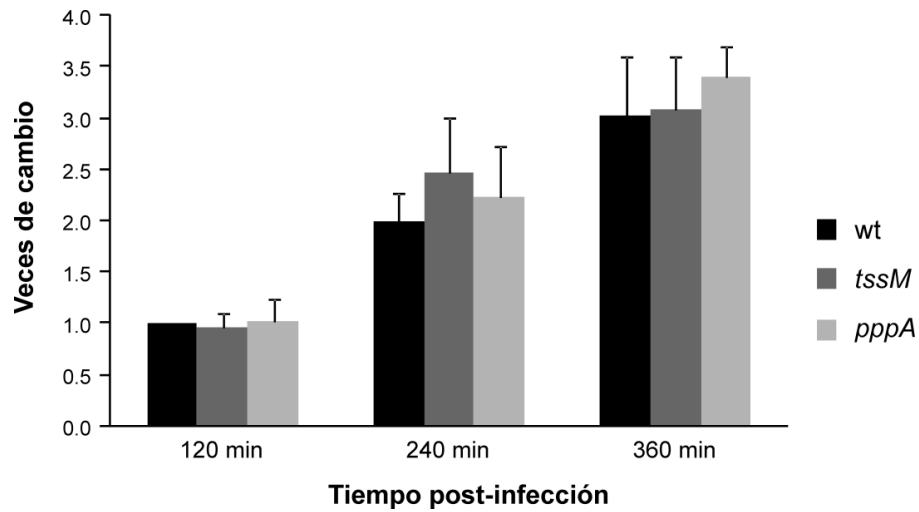


Figura IV.30. Ensayos de protección a kanamicina en células CHO. Se realizaron ensayos de protección a kanamicina en células CHO con MOI=10 utilizando *S. marcescens* RM66262 silvestre (wt) o mutantes *tssM* y *pppA*. A los tiempos indicados, se determinaron las UFC intracelulares. Se calcularon las veces de cambio considerando el porcentaje de UFC intracelulares obtenido para la cepa silvestre a 120 min p.i. como la unidad. En el gráfico se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos.

IV.3. DISCUSIÓN

La competencia interbacteriana en un nicho compartido ha permitido la selección evolutiva de mecanismos de defensa y ataque. Los SST6 son armas potentes que le otorgan a las bacterias la habilidad de antagonizar dinámicamente con sus competidores. Si bien hay cada vez más reportes de los detalles estructurales y del ensamblado del SST6, los mecanismos que permiten la regulación de la expresión de un sistema tan complejo y energéticamente costoso están lejos de ser conocidos.

Este capítulo se enfocó en comprender los mecanismos que regulan la expresión del SST6 de *S. marcescens* RM66262 en encuentros bacterianos intra o interespecíficos. Los resultados obtenidos demuestran que *S. marcescens* RM66262 tiene un SST6 funcional en las condiciones ensayadas y que presenta termorregulación a nivel transcripcional, siendo mayor su expresión a 37°C con agitación. Los niveles de expresión del SST6 son modulados a nivel transcripcional por RcsB, el regulador de respuesta del sistema Rcs. Se determinó que RcsB interacciona directamente con el motivo que se encuentra en la región promotora del *cluster* génico que codifica para los componentes del SST6, controlando los niveles de transcripcionales del SST6, como se demostró por RT-qPCR y utilizando como reportero una fusión transcripcional a *gfp*. Los niveles de Hcp secretado y los ensayos de competencia interbacteriana permitieron corroborar que la regulación del SST6 dependiente de RcsB impacta tanto en la expresión como en el ensamblado y, consecuentemente, en la funcionalidad del SST6. Realizando un análisis *in silico*, se encontró que el motivo de unión a RcsB está muy conservado en la región promotora del *cluster* que codifica para los componentes del SST6 en diversas cepas de *Serratia*, aisladas tanto de hospedadores como del ambiente, indicando que una fuerte presión selectiva podría haber permitido la preservación de la regulación del SST6 RcsB-dependiente.

Cuando *S. marcescens* RM66262 y *S. marcescens* Db10 son ensayadas en competencias intraespecífica, se puede observar que ambas cepas son capaces de eliminar a la otra de un modo dependiente del SST6 de la atacante. Los resultados obtenidos al monitorear la expresión transcripcional del *cluster* génico del SST6 de *S. marcescens* RM66262 demuestran que existe una inducción en respuesta al encuentro con una cepa con un SST6 funcional, es decir con una cepa agresiva. Además, se demostró que dicha inducción es dependiente de RcsB. Se determinó que *S. marcescens* silvestre es incapaz de eliminar a otra cepa de *S. marcescens* mutante en SST6, demostrando que, en un ensayo intraespecífica, sólo una cepa con un SST6 funcional puede ser detectada por la agresora y, por lo tanto, puede ser responsable de la inducción de la expresión del SST6. Las cepas mutantes en SST6 están protegidas de los niveles constitutivos del SST6 del agresor por la expresión de las proteínas de inmunidad. La comparación *in silico* entre los genomas de *S. marcescens* RM66262 y *S. marcescens* Db11 permitió encontrar genes que codifican para 16 efectores o proteínas de inmunidad con alta identidad en la secuencia aminoacídica.

Es tentador asociar este comportamiento intraespecífico con el tipo de contraataque denominado “Tit-for-Tat” descrito para *Pseudomonas* (97). Como se mencionó previamente, en ese trabajo se demostró que el ensamblado del SST6 es activado por señales provocadas por oponentes que tienen un SST6 funcional y mediado por la cascada de respuesta TagQRST/PppA-PpkA. Es importante destacar que en el genoma de *S. marcescens* no se encuentran genes que codifiquen para proteínas homólogas a TagQRST. En este capítulo de Tesis se describe una regulación transcripcional en la cual una señal ocasionada por el encuentro con una cepa que posee un SST6 funcional estimula a una cepa a volverse más atacante, tanto con cepas agresivas como con cepas inocuas. En contraposición con el mecanismo “Tit-for-Tat”, la estrategia descrita le permite a *Serratia* llevar a cabo un ataque no direccionado (Figura IV.31).

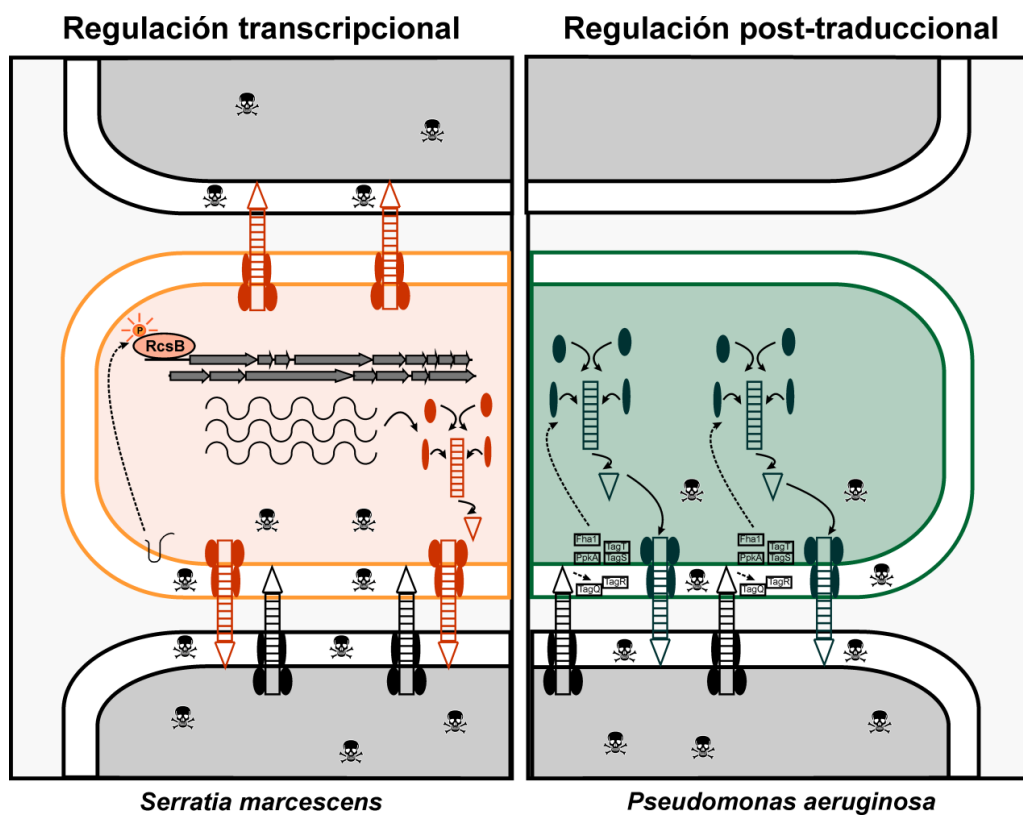


Figura IV.31. Modelo comparativo entre la regulación post-transcripcional reportada para *P. aeruginosa* y el modelo postulado en este capítulo para *S. marcescens*. En naranja se muestra a *S. marcescens* y en verde, a *P. aeruginosa*. En gris se muestran bacterias agresivas o inocuas. Según lo publicado previamente, cuando *Pseudomonas* detecta un ataque, se activa la cascada de transducción de señales TagQRST/PppA-PpkA y se produce una respuesta direccionada. Los resultados obtenidos en este capítulo de Tesis permiten postular un modelo en el cual cuando *Serratia* detecta un ataque, RcsB se une a la región promotora del *cluster* génico que codifica para los componentes del SST6, activando su transcripción y ocasionando un contraataque no direccionado.

Según los resultados obtenidos en este capítulo, el comportamiento de *Serratia* difiere de lo previamente reportado. Gerc y colaboradores postularon que, en *S. marcescens* Db10, el ensamblado del SST6 es estocástico y permite a *Serratia* estar lista para un ataque sin importar si el encuentro es con una cepa que posee o no un SST6 funcional (108). Esta aparente contradicción puede ser atribuida a las diferencias que en los efectores y proteínas de

inmunidad codificados en los genomas de las diferentes cepas de *Serratia* utilizadas para los ensayos de competencia interbacteriana.

Por otro lado, cuando se examinaron las interacciones interespecíficas entre *Serratia* y *Acinetobacter*, se encontró que tanto *A. baumannii* como *A. nosocomialis* son capaces de eliminar a *S. marcescens*. Se demostró que es necesaria la acción coordinada de los efectores asociados a VgrG2 y VgrG3 (una nucleasa y un efector con actividad desconocida hasta el momento, respectivamente) de *A. baumannii* para la eliminación de *S. marcescens*. Al evaluar la inducción transcripcional en la competencia interespecífica, se observó que *Acinetobacter* es capaz de inducir la actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6 de un modo dependiente de RcsB y que sólo las cepas capaces de eliminar a *S. marcescens* son capaces de inducir la expresión del SST6.

Con el objetivo de encontrar la señal inductora de la transcripción del *cluster* génico del SST6 y considerando que el sistema Rcs responde a estrés de envoltura, se ensayó la acción de diversos agentes que perturban la envoltura bacteriana (SDS, Polimixina B y Deoxicolato de sodio) en concentraciones sub-letales. Se demostró que dichos agentes no tienen efecto sobre la actividad del reportero transcripcional, indicando que las alteraciones de membrana producidas por la acción de los mismos son incapaces de inducir la transcripción del *cluster* génico del SST6. Además, los resultados obtenidos demuestran que si se expone una cepa que contiene el plásmido reportero transcripcional del SST6 a lisados de *Serratia* o a los productos liberados luego de una competencia interbacteriana tampoco hay inducción de la actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6. Por último, se puede concluir que el contacto del SST6 ensamblado de una cepa atacante con la envoltura celular de una presa no es suficiente para activar la expresión del SST6.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que la inducción observada es producto de la acción específica de efectores translocados por el SST6 de la atacante. Efectivamente, al co-incubar *S. marcescens* con una cepa de *A. baumannii* mutante sólo en el gen que codifica para el efector Tse3, no se observa inducción del reportero transcripcional. Este resultado refuerza la hipótesis de que la translocación de efectores al citoplasma/periplasma y/o la acción de los mismos es responsable de producir la inducción transcripcional del *cluster* génico del SST6. Es más, si se comparan los niveles de inducción del reportero y las UFC recuperadas en los ensayos de competencia interbacteriana, se puede observar que, a mayor eliminación de la presa, hay mayor inducción transcripcional. La co-incubación con *E. coli* MC4100, una cepa que no posee un SST6 codificado en su genoma, es incapaz de activar la inducción del SST6, indicando que existe un nivel basal de expresión del SST6 que es suficiente para producir la eliminación de un rival inocuo. Cuando *S. marcescens* se encuentra con otra cepa de *S. marcescens* que posee un SST6 funcional, el nivel de daño está balanceado entre la acción de los efectores y la presencia de las proteínas de inmunidad. En esta situación de eliminación bacteriana leve, hay una inducción transcripcional leve

IV.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta Tesis permiten formular las siguientes conclusiones:

- *S. marcescens* RM66262 contiene en su genoma un *cluster* génico que codifica para los componentes del SST6 y genes que codifican para efectores y proteínas de inmunidad, con una alta identidad al publicado previamente para *S. marcescens* Db11.
- El SST6 de *S. marcescens* RM66262 es funcional en las condiciones ensayadas y los niveles de expresión del SST6 son modulados a nivel transcripcional y de forma directa por RcsB, pero no por la cascada regulatoria flagelar ni por los sistemas PhoPQ y CpxRA.
- La transcripción del *cluster* génico del SST6 se induce, de forma dependiente de RcsB, en respuesta al encuentro con una cepa con un SST6 funcional, es decir con una cepa agresiva, tanto en competencias intraespecíficas como interespecíficas. A mayor cantidad de órdenes de eliminación bacteriana, hay una mayor inducción transcripcional.
- El motivo de unión a RcsB que se encuentra en la región promotora del *cluster* génico del SST6 está muy conservado en diversas cepas de *Serratia* aisladas tanto de hospedadores como del ambiente, sugiriendo una fuerte presión selectiva a favor de la conservación de este mecanismo regulatorio en *Serratia*.
- La perturbación de la envoltura bacteriana por la acción de diversos agentes en concentraciones sub-letales, la exposición del reportero transcripcional a lisados de *Serratia* o a productos liberados por la competencia, o el contacto con el SST6 ensamblado de una cepa atacante no son factores capaces de alterar los niveles de actividad transcripcional del *cluster* génico del SST6. Esto señala que la inducción transcripcional es producto de la acción específica de efectores translocados por el SST6 de la atacante.
- *S. marcescens* RM66262 es capaz de eliminar a *E. coli* MC4100, a *E. aerogenes* ATCC13048 y a *S. marcescens* Db10 de un modo dependiente de su SST6. *S. marcescens* RM66262 puede eliminar a *S. marcescens* Db10 sólo cuando tanto la atacante como la presa poseen un SST6 funcional.
- El SST6 de *S. marcescens* no tiene un rol relevante en la invasión y replicación en células CHO.

V. Capítulo II. Mecanismo de egreso de *S. marcescens* luego de la invasión en células no fagocíticas.

V.1. INTRODUCCIÓN

El mecanismo de egreso luego de la invasión a células eucariotas es un paso clave en el proceso de diseminación bacteriana y garantiza la dispersión del patógeno a otras células, tejidos o incluso a otros hospedadores. Si bien el egreso bacteriano no es un proceso tan conocido y descrito como la internalización o la sobrevivencia intracelular, se reportaron varias estrategias de egreso que pueden ser catalogadas como líticas o no líticas, dependiendo de si causan o no daño a la célula hospedadora (163, 205).

Muchas toxinas formadoras de poros (PFTs) secretadas por patógenos están involucradas en la liberación de bacterias desde la vacuola al citosol de la célula hospedadora, gracias a su capacidad de alterar la integridad de la membrana vacuolar. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la identidad de los efectores responsables de manipular la fisiología de la célula para provocar el egreso es desconocida.

Como se mencionó en la introducción general, en el laboratorio se demostró que *S. marcescens* es capaz de invadir, proliferar y sobrevivir en células no fagocíticas en el interior de una vacuola con características de autofagosoma, denominada SeCV (20). Una característica particular de *Serratia* es la habilidad de producir y secretar diversos efectores, incluyendo proteasas, lipasas, nucleasas y PFTs.

La hemolisina ShIA es una PFT y es uno de los factores de virulencia mejor estudiado de *S. marcescens*, siendo clave para su patogénesis (15, 21, 140, 147). ShIA es sintetizada como un precursor inactivo de 165 kDa que contiene una secuencia señal en el extremo N-terminal. Luego de ser translocada a través de la membrana plasmática en un proceso dependiente del sistema Sec y del corte de la secuencia señal, ShIA se encuentra inactiva en el periplasma. La proteína ShIB, localizada en la membrana externa, es la responsable del transporte desde el periplasma al medio externo y la conversión de ShIA a la forma hemolítica activa (23).

Durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que, luego de la invasión y la replicación en células no fagocíticas, *Serratia* lleva a cabo un mecanismo de egreso que no daña a la célula hospedadora (145). Este mecanismo es dependiente de la hemolisina ShIA.

Conociendo estos antecedentes, en este capítulo de Tesis se propone profundizar la caracterización del mecanismo de egreso dependiente de ShIA llevado a cabo por *Serratia*. Este capítulo de Tesis se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Gisela Di Venanzio durante su período postdoctoral realizado en el laboratorio.

V.2. RESULTADOS

V.2.1. Rol de la hemolisina ShIA en el mecanismo de egreso

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, *S. marcescens* es capaz de egresar de la célula hospedadora, a diferencia de la mutante *shIBA*, lo cual se evidencia por la ausencia de bacterias en el medio extracelular y la acumulación de bacterias intracelulares a tiempos tardíos. Para verificar que la falta de expresión de ShIA es responsable del fenotipo observado en la cepa mutante *shIBA* y considerando que la sobreexpresión de *shIBA* desde un vector produce artefactos causados por la elevada expresión de una toxina formadora de poros, se evaluó el fenotipo causado por una mutante en el transportador *shIB*. Esta mutante no posee la capacidad de secretar y activar ShIA. Además, se ensayó la complementación en *trans* del gen *shIB* desde un vector plasmídico.

En primer lugar, y con el fin de corroborar que la complementación de *shIB* en *trans* es funcional, se realizaron ensayos de actividad hemolítica y de inmunodetección de ShIA en sobrenadantes de cultivo. Se crecieron cultivos de las cepas indicadas durante 16 h a 30°C. Los sobrenadantes de dichos cultivos se concentraron por precipitación con TCA y se separaron mediante un SDS-PAGE. Posteriormente se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-ShIA. Se incubaron los mismos cultivos bacterianos con eritrocitos humanos durante 1 h y se determinó la liberación de hemoglobina realizando medidas de absorbancia a 562 nm. Las veces de cambio se calcularon relativas al valor obtenido para la cepa silvestre.

Según lo reportado previamente (133), la mutante *shIB* no secreta ShIA y no posee actividad hemolítica (Figura V.1A). Como se puede ver en la Figura V.1A, la complementación de la mutante *shIB* rescata el fenotipo, ya que se observan niveles de ShIA secretada y de actividad hemolítica similares a los de la cepa silvestre.

A continuación, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares. Como se mencionó en la introducción, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró en su Tesis Doctoral que la mutante *shIBA* no posee la capacidad de egresar de la célula invadida y, por lo tanto, que dicha mutante se acumula intracelularmente a 360 min p.i. (Figura V.1B). Este fenotipo puede ser rescatado al expresar *shIB* desde un plásmido (Figura V.1B). Estos resultados permiten corroborar que la secreción y activación de ShIA es responsable de las diferencias observadas en las UFC intracelulares entre la cepa silvestre y la mutante *shIBA*.

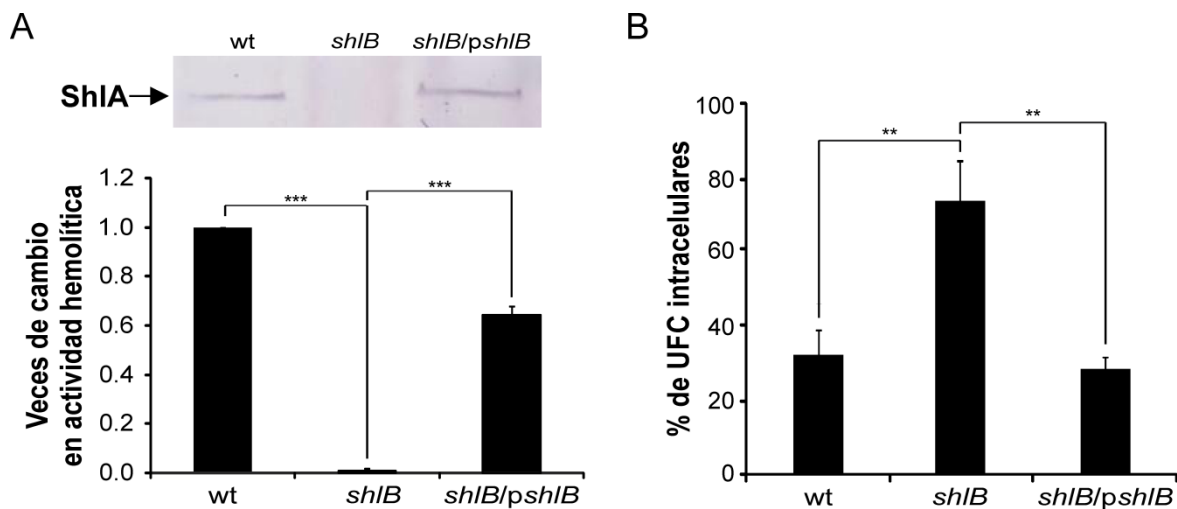


Figura V.1. Evaluación de la actividad hemolítica, secreción de ShIA y porcentaje de UFC intracelulares en la mutante *shIB* y su complementación en *trans*. **A)** Se cultivaron las bacterias durante 16 h a 30°C. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron, concentraron por precipitación con TCA y resuspendieron en solución de siembra desnaturalizante. Se separaron las muestras mediante un SDS-PAGE y se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-ShIA (panel superior). Con el fin de determinar la actividad hemolítica, se incubaron los cultivos bacterianos con eritrocitos humanos y se determinó la liberación de hemoglobina realizando medidas de absorbancia a 562 nm. En la parte inferior de la figura se muestran las veces de cambio en la actividad hemolítica relativas al valor obtenido para la cepa silvestre (wt). Se indican los promedios \pm S.D. para cinco experimentos independientes (** $p < 0,001$). Se muestra una imagen representativa de los geles. **B)** Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt), mutante *shIB* o mutante complementada (*shIB/pshIB*) con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares. Se calculó el porcentaje de UFC intracelulares relativo al inóculo. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$).

V.2.2. Caracterización del mecanismo de egreso

Con el objetivo de monitorear el egreso de *S. marcescens* luego de la invasión, se realizó una video-microscopía utilizando células CHO invadidas con la cepa silvestre conteniendo plásmido *pgfp*. Se adquirieron imágenes de fluorescencia y contraste de fase en simultáneo cada 30 s. La video-microscopía (Video V.1) muestra la liberación de todo el contenido de la SeCV al medio extracelular, dando indicios de que el proceso podría ser de tipo exocítico (Figura V.2).

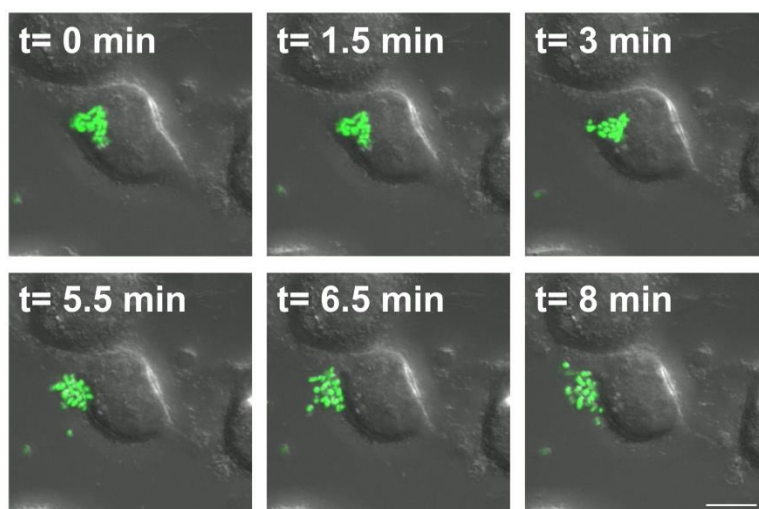


Figura V.2. Imágenes de la video-microscopía mostrando el egreso de *Serratia*. Se infectaron células CHO con *S. marcescens* silvestre/*pgfp* (fluorescencia verde) con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A 240 min p.i., se lavaron las células y se agregó medio de cultivo libre de antibiótico. Se analizaron las células por microscopía confocal y se capturaron imágenes cada 30 s entre los 352 min p.i. (t=0 min) y 360 min p.i. (t=8 min). Se muestran imágenes representativas.

Hertle y Schwarz describieron que la hemolisina ShIA produce citotoxicidad desde el medio externo en distintas líneas celulares (15). Durante el proceso de egreso a partir de la célula invadida, *S. marcescens* podría estar ejerciendo un efecto citotóxico desde el interior celular provocando daño o incluso la lisis de la célula eucariota. Alternativamente, las bacterias podrían estar saliendo por un proceso controlado que no implica daño a la célula hospedadora. En su Tesis Doctoral, la Dra. Di Venanzio demostró que ni la invasión ni el egreso de *S. marcescens* producen la liberación de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular (145), indicando que no hay alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula eucariota.

Para complementar dicho resultado, se procedió a realizar una tinción diferencial que distingue células intactas de células cuya integridad de membrana está alterada. Se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 360 min p.i., se agregó un fluoróforo que puede atravesar membranas eucariotas intactas (SYTO 9) y uno que no lo hace (ioduro de propidio). Se capturaron imágenes por microscopía confocal y se determinó el porcentaje de células vivas. Todas las células incorporan el fluoróforo SYTO 9, en contraposición, sólo las células cuya integridad de membrana se encuentra alterada incorporan ioduro de propidio. Ni las células invadidas con la cepa silvestre ni con la mutante *shIBA* incorporaron ioduro de propidio (Figura V.3A). Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1 % Tritón X-100 como control y no se detectaron células vivas (Figura V.3A). Este resultado, en conjunto con la medida de LDH, permite concluir que la invasión y el egreso de *Serratia* no alteran la permeabilidad de la célula invadida.

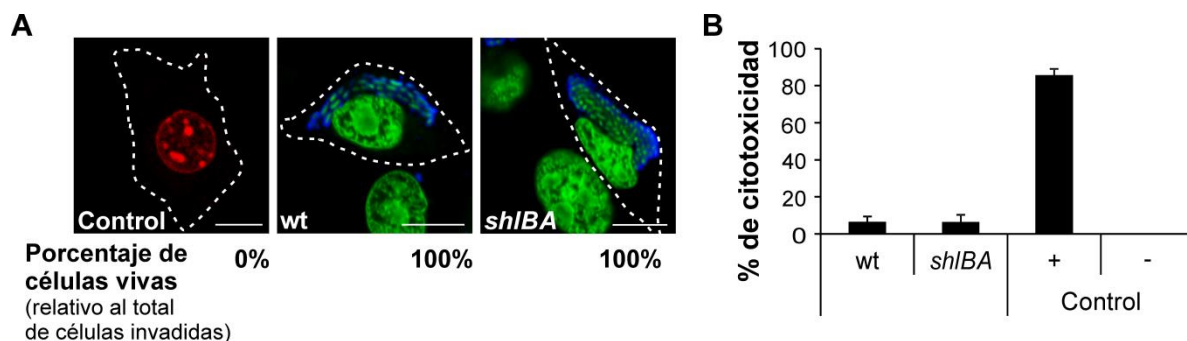


Figura V.3. Ensayos de permeabilidad y de viabilidad celular. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. **A)** A 360 min p.i., se agregaron los fluoróforos ioduro de propidio (fluorescencia roja) y SYTO 9 (fluorescencia verde). Las bacterias intracelulares se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-*Serratia* (fluorescencia azul). Se utilizaron células no invadidas y tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control. Se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal. Las líneas de puntos marcan el borde de la célula eucariota. Barras: 10 μ M. En la parte inferior de la figura, se indica el porcentaje de células vivas (teñidas sólo con SYTO 9) relativo al total de células invadidas. **B)** A 360 min p.i., se lavaron las células y se agregó MTT. Luego de la incubación, se disolvieron los cristales de formazán y se midió absorbancia a 570 nm y 630 nm. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo (+) y células sin invadir y sin tratar como control negativo (-). Se indican los promedios \pm S.D. para cinco experimentos.

Posteriormente, y con el fin de evaluar si la viabilidad de la célula hospedadora se encuentra alterada en presencia de *Serratia*, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 360 min p.i., se lavaron las células y se

agregó el compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). El MTT es reducido por una oxidoreductasa mitocondrial dependiente de NAD(P)H a formazán. La generación de este compuesto se considera proporcional al número de células viables. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Los resultados de este ensayo permiten concluir que ni la cepa silvestre ni la mutante *shIBA* afectan la viabilidad de la célula hospedadora en el proceso de invasión y egreso (Figura V.3B).

Para descartar la posibilidad de que las células dañadas se puedan haber despegado de la placa de cultivo y haber pasado por alto el daño de las mismas en los ensayos anteriores por la remoción de los sobrenadantes, se cuantificó el porcentaje de células permeabilizadas y no permeabilizadas tanto en la monocapa como en los sobrenadantes. Se realizó un ensayo de protección a gentamicina en células CHO utilizando *S. marcescens* silvestre/*pgfp* o *S. marcescens shIBA/pgfp* con una MOI=10. A 360 min p.i., se recuperaron las células del sobrenadante y de la monocapa y se realizó una tinción *in vivo* con yoduro de propidio. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Se analizaron las muestras por citometría de flujo.

Las partículas con una alta intensidad de fluorescencia verde corresponden a células invadidas y las que poseen alta intensidad de fluorescencia roja corresponden a células permeabilizadas (ya que incorporaron el fluoróforo yoduro de propidio). En la Figura V.4 se puede observar que no se detectaron células en los sobrenadantes de cultivo. Esto indica que no hay células que se desprendan de la monocapa y que puedan estar permeabilizadas. Por otro lado, tanto en las monocapas invadidas con la cepa silvestre como con la mutante *shIBA* no se detectaron células permeabilizadas (con alta intensidad de fluorescencia roja, es decir teñidas con yoduro de propidio, Figura V.4). Este resultado coincide con el observado en la Figura V.3A y permite concluir que *Serratia* no altera la permeabilidad de la célula hospedadora.

En resumen, los ensayos mostrados hasta el momento permiten concluir que ni la cepa silvestre ni la mutante *shIBA* alteran la viabilidad celular ni la integridad de la membrana plasmática, demostrando que el mecanismo de egreso llevado a cabo por *Serratia* no ocasiona daño a la célula hospedadora, por lo tanto sería un mecanismo de egreso de tipo no lítico.

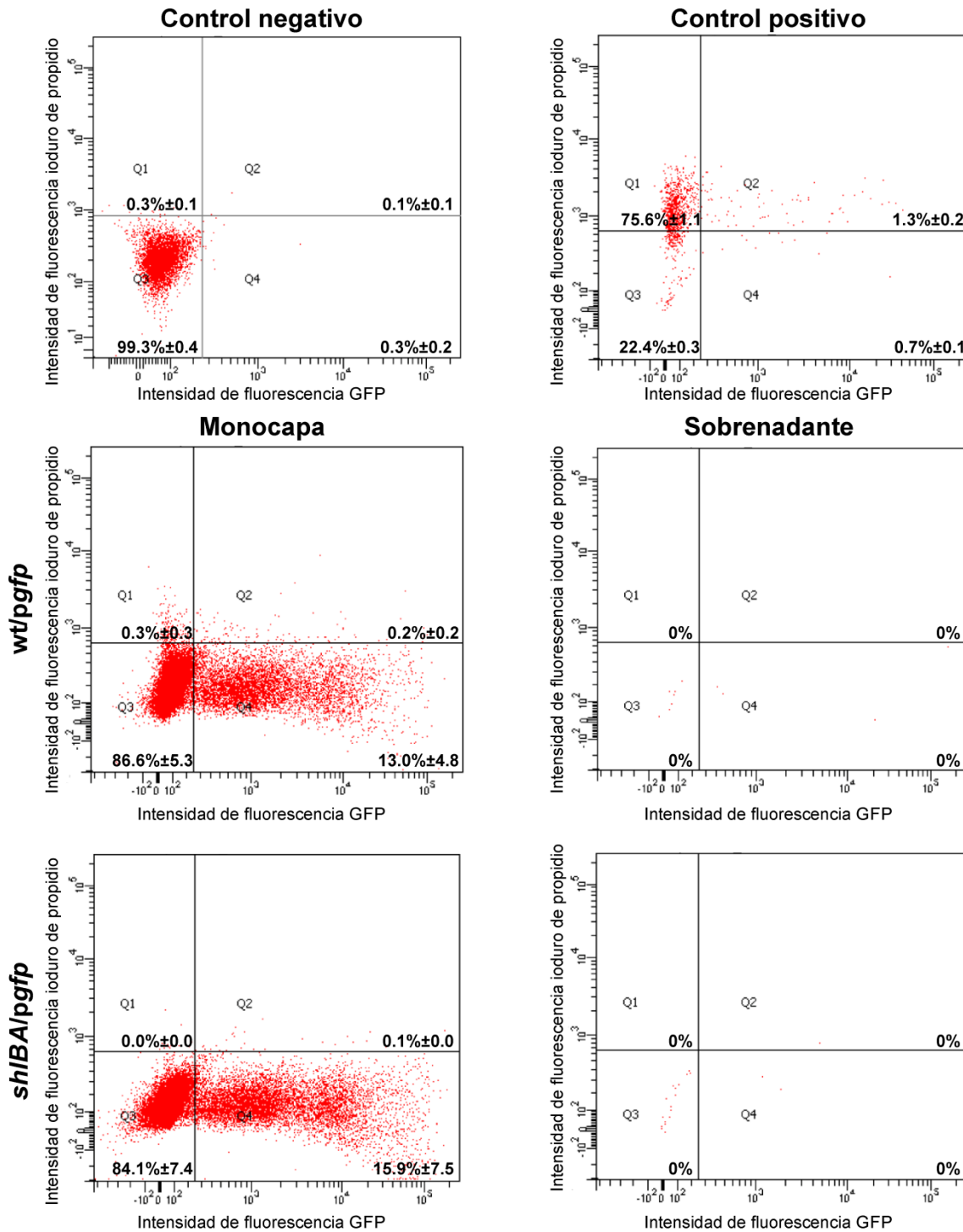


Figura V.4. Ensayos de permeabilidad celular. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre/*pgfp* (*wt/pgfp*) o mutante *shIBA/pgfp* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A 360 min p.i., se recuperaron las células del sobrenadante y de la monocapa y se realizó una tinción *in vivo* con yoduro de propidio (IP). Se analizaron las muestras por citometría de flujo. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Las señales en el cuadrante Q1 (alta señal de IP y baja señal de GFP) corresponden a células no invadidas y permeabilizadas. Las señales en el cuadrante Q2 (alta señal de IP y alta señal de GFP) corresponden a células invadidas y permeabilizadas. Las señales en el cuadrante Q3 (baja señal de IP y baja señal de GFP) corresponden a células no invadidas y no permeabilizadas. Las señales en el cuadrante Q4 (baja señal de IP y alta señal de GFP) corresponden a células invadidas y no permeabilizadas. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos.

En su Tesis Doctoral la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que el escape desde la SeCV no involucra un pasaje a través del citosol de la célula invadida. Como se mencionó en la

introducción general, algunos patógenos entre los cuales se encuentra *Chlamydia*, llevan a cabo un mecanismo de egreso denominado extrusión. Este mecanismo es de tipo no lítico y no involucra un pasaje por el citosol de la célula eucariota. Las bacterias extracelulares resultantes se encuentran rodeadas por la membrana plasmática de la célula hospedadora (168). Con el objetivo de determinar si el mecanismo de salida de *Serratia* es de tipo extrusión, se realizó un ensayo de susceptibilidad a gentamicina en bacterias extracelulares. Miao y colaboradores (175) reportaron este ensayo cuyo fin es distinguir las bacterias libres (susceptibles a gentamicina) de las que egresan rodeadas de una membrana derivada de la célula hospedadora (resistentes a gentamicina). Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min p.i., se lavaron las células y se agregó medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se recuperó el sobrenadante de cultivo y se sometió a centrifugaciones para eliminar restos celulares. Luego se hizo un tratamiento de 1 h con gentamicina en presencia o ausencia de 0,1% Tritón X-100 y se realizó un recuento de UFC para evaluar la sobrevivencia bacteriana en cada condición.

Las bacterias recuperadas de sobrenadante fueron igualmente susceptibles a gentamicina tanto en presencia como ausencia del pre-tratamiento con Tritón X-100 (Tabla V.1). Este resultado indica que *Serratia* no egresa rodeada de membranas provenientes de la célula hospedadora y permite descartar el mecanismo de egreso de tipo extrusión.

Tratamiento		Sobrevivencia bacteriana (%)
Gentamicina	Permeabilización (Tritón X-100)	
-	-	100
+	-	0
+	+	0

Tabla V.1. Ensayo de susceptibilidad a gentamicina en bacterias extracelulares. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., se lavaron las células y se agregó medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se recuperó el sobrenadante de cultivo y se realizaron los tratamientos indicados en la tabla. Se realizó el ensayo por triplicado.

V.2.3. Rol del calcio en el mecanismo de egreso

Previamente, se reportó que un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular dispara mecanismos exocíticos, incluso en células no secretorias (206, 207). Considerando que algunos patógenos, como *Legionella* o *Porphyromonas*, llevan a cabo un mecanismo de egreso tipo exocítico (165, 166) y que estos mecanismos son no líticos y no involucran un paso por el citosol de la célula hospedadora, examinamos si el mecanismo de egreso de *Serratia* es de tipo exocítico. En primer lugar, se evaluó si la expresión de ShIA es capaz de inducir una movilización de Ca^{2+} intracelular. Para ello, se monitorearon *in vivo* los niveles de Ca^{2+} intracelular con el fluoróforo de Ca^{2+} Fluo-3 AM. Este compuesto es capaz de atravesar las membranas eucariotas y, cuando se encuentra en el interior celular, el grupo acetoximetilo (AM) es removido por esterasas citoplásmicas. Sólo luego de la remoción del grupo AM es capaz de unir Ca^{2+} , por lo tanto, sólo exhibe un aumento en la intensidad de fluorescencia al

detectar un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO utilizando *S. marcescens* silvestre/*pcherry* o *S. marcescens shIBA/pcherry* con una MOI=10 y a 210 min p.i., se adicionó Fluo-3 AM. Se capturaron las imágenes por microscopía confocal *in vivo* 30 min después.

Se detectó señal fluorescente de Fluo-3 AM yuxtapuesta a o co-localizando con el 82,5% de las wt-SeCV, vacuolas que contienen a *Serratia* silvestre (Figura V.5, panel superior). Sin embargo, sólo el 5,3% de las *shIBA*-SeCV (vacuolas que contienen a la cepa mutante *shIBA*) se detectaron en asociación con la señal de Fluo-3 AM (Figura V.5, panel inferior). Este resultado demuestra claramente que cuando *Serratia* se encuentra dentro de la SeCV provoca un aumento localizado en la concentración de Ca^{2+} intracelular, de un modo dependiente de ShIA.

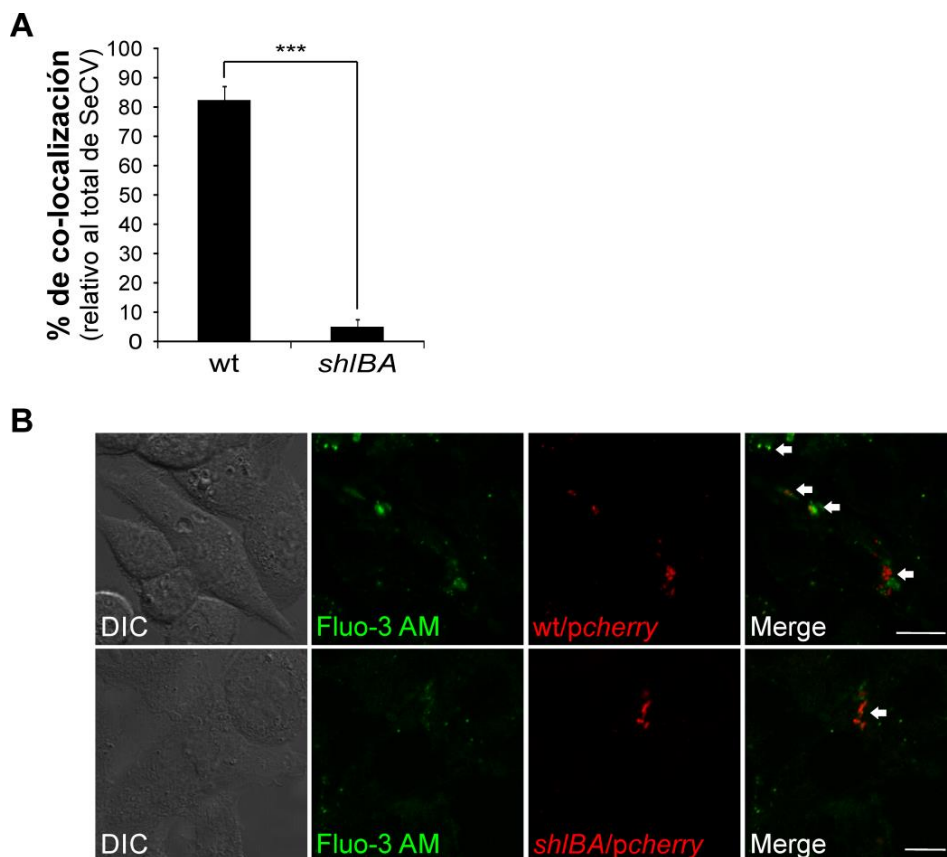


Figura V.5. Co-localización de *Serratia* con el fluoróforo de Ca^{2+} intracelular. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre/*pcherry* (*wt/pcherry*, fluorescencia roja) o mutante *shIBA/pcherry* (fluorescencia roja) con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 210 min p.i., se adicionó Fluo-3 AM (fluorescencia verde). **A)** Se calculó el porcentaje de SeCV que co-localizan con Fluo-3 AM relativo al total de SeCV. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos (***) $p < 0,001$. **B)** Se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal. Las flechas señalan las SeCV. Barras: 10 μM .

Para obtener más detalles del proceso, se secuestró el Ca^{2+} para bloquear los eventos exocíticos y se observó el efecto sobre el egreso de *Serratia*. Se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min p.i. se agregó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con EGTA o con el quelante específico de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM. A 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares y extracelulares. Una reducción en las UFC extracelulares acompañada por un aumento en las UFC

intracelulares indica un bloqueo en el mecanismo de egreso de *Serratia*.

El BAPTA-AM es un quelante específico de Ca^{2+} intracelular ya que en su estructura contiene el grupo AM (presente también en el Fluo-3 AM). En contraposición, el EGTA es capaz de secuestrar Ca^{2+} extracelular.

Cuando se ensayó la cepa silvestre, el agregado de BAPTA-AM produjo un aumento del 44% en las UFC intracelulares, mientras que ocasionó una disminución del 37% en las UFC extracelulares, respecto al control sin tratar (Figura V.6A y B). En contraposición, cuando se evaluó el efecto del agregado de BAPTA-AM a células invadidas con la cepa mutante *shIBA*, no se obtuvieron diferencias significativas en las UFC intracelulares o extracelulares (Figura V.6A y B). Además, y con el fin de inhibir el influjo de Ca^{2+} en células CHO, se secuestró el Ca^{2+} extracelular agregando EGTA al medio de cultivo libre de antibiótico. Se calculó la concentración de EGTA a utilizar con el programa MaxChelator para dejar una concentración de Ca^{2+} libre extracelular despreciable. El tratamiento con EGTA ocasionó una reducción del 34% en las UFC extracelulares y produjo un aumento del 60% en las UFC intracelulares de la cepa silvestre (Figura V.6A y B), comparado con la condición control. Las UFC intracelulares o extracelulares obtenidas para la cepa mutante *shIBA* no se vieron afectadas por el agregado de EGTA (Figura V.6A y B).

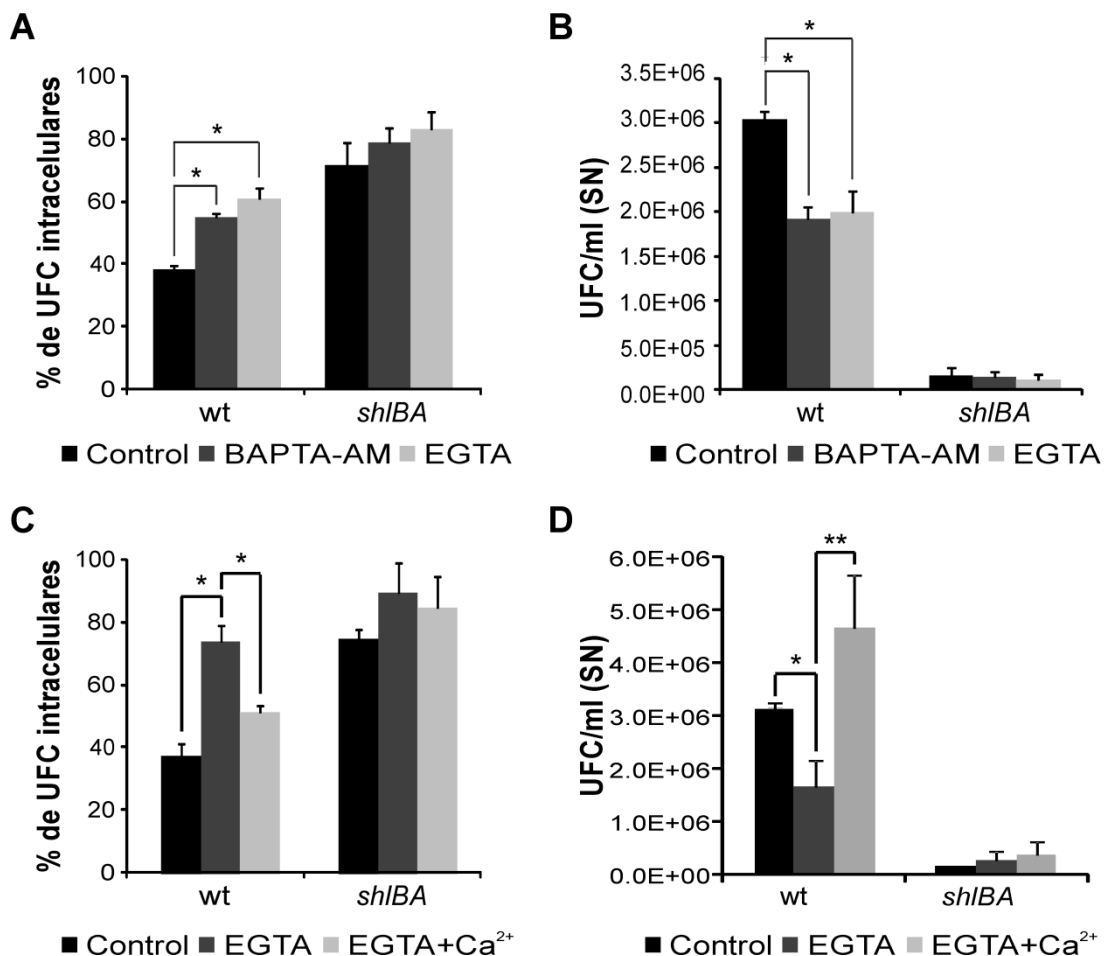


Figura V.6. Ensayos de egreso en presencia de quelantes de Ca^{2+} . Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de antibiótico

suplementado con 2 mM EGTA, 2 mM EGTA + 2 mM CaCl₂ o 40 μM BAPTA-AM. A 360 min p.i. se determinaron las UFC **A y C** intracelulares y **B y D** extracelulares. El porcentaje de UFC intracelulares se calculó relativo al inóculo y las UFC en sobrenadante (SN) se calcularon por ml. Se indican los promedios ± S.D. para cuatro experimentos independientes (* p<0,05 y ** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control para cada cepa.

Como se puede ver en la Figura V.6C y D, la adición de EGTA y Ca²⁺ (en una concentración suficiente para restaurar los niveles de Ca²⁺ libre en las células no tratadas) revierte el fenotipo observado al agregar sólo EGTA. Estos resultados en conjunto demuestran que el Ca²⁺ tiene un rol crítico en el proceso de egreso de *Serratia*, sugiriendo que el mecanismo de egreso podría ser de tipo exocítico.

Posteriormente, se examinó si el secuestro de Ca²⁺ por un período de tiempo mayor al ensayado previamente produce un desbalance del equilibrio entre el Ca²⁺ intracelular y extracelular que pueda afectar al egreso de *Serratia*. Al mismo tiempo, se propuso ensayar concentraciones menores de EGTA. En la Tabla V.2 se muestran las concentraciones de EGTA utilizadas y las concentraciones de Ca²⁺ libre estimadas usando el programa bioinformático Max Chelator.

Concentración de EGTA [μM]	Concentración de Ca ²⁺ libre estimada [μM]
0	2000
250	1750
500	1500
1000	1000
1500	500
2000	10

Tabla V.2. Concentraciones de EGTA ensayadas y concentraciones de Ca²⁺ libre estimadas.

En primer lugar, se ensayó el efecto del tratamiento con EGTA durante todo el ensayo en células CHO invadidas con la cepa silvestre (tratamiento de 6 h). En este caso, las células que fueron co-incubadas con *Serratia* se mantuvieron adheridas a la placa hasta la concentración de EGTA 1000 μM. A continuación, se ensayó el efecto de las distintas concentraciones de EGTA durante un período de 2 h en células invadidas con *Serratia*. En este caso, las células se mantuvieron adheridas a la placa de cultivo en todas las concentraciones de EGTA ensayadas.

Habiendo determinado las concentraciones de EGTA y los tiempos de tratamiento a los que sobreviven las células CHO invadidas, se realizaron ensayos de protección a gentamicina con una MOI=10. A 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico y a 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares. Las concentraciones indicadas de EGTA se mantuvieron durante todo el ensayo (desde la invasión hasta la recuperación de las UFC extracelulares, tratamiento de 6 h) o entre 240 y 360 min p.i. (tratamiento de 2 h).

Como se puede ver en la Figura V.7A, la adición de EGTA hasta la concentración 1000

μM durante todo el ensayo (tratamiento de 6 h) no afectó el egreso de *Serratia*. Al analizar el efecto del agregado de EGTA durante las últimas 2 h del ensayo, se puede observar que sólo la concentración 2000 μM tiene un efecto sobre la cantidad de UFC recuperadas en sobrenadante, es decir que sólo dicha concentración altera el egreso de *Serratia* (Figura V.7B). Estos resultados permiten concluir que para bloquear el egreso de *Serratia* es necesario que el Ca^{2+} libre extracelular se mantenga a una concentración despreciable, al menos durante las últimas 2 h del ensayo.

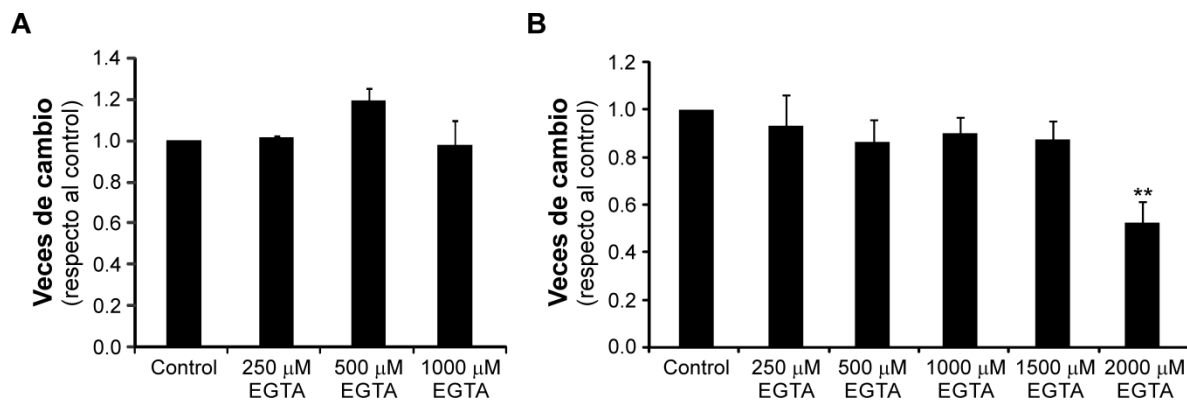


Figura V.7. Ensayos de egreso en presencia de EGTA. Se infectaron células CHO con *S. marcescens* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares. **A)** El EGTA se mantuvo durante todo el ensayo (tratamiento de 6 h). **B)** El EGTA se suplementó entre 240 y 360 min p.i. (tratamiento de 2 h). Se calcularon las veces de cambio respecto al control sin tratar. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control.

Con los resultados mostrados hasta el momento, se puede concluir que *Serratia* produce un incremento localizado en la concentración de Ca^{2+} intracelular de un modo dependiente de ShIA y que este aumento en la concentración de Ca^{2+} estimula un mecanismo de tipo exocítico que permite el egreso del patógeno. Al secuestrar el Ca^{2+} (utilizando BAPTA-AM o EGTA), se impide el egreso de *Serratia* silvestre. En contraposición, la mutante *shIBA* no es capaz de producir un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, por lo tanto, secuestrar el Ca^{2+} no tiene efecto. En consecuencia, se examinó si al producir un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de forma farmacológica se puede estimular el egreso de la cepa mutante. La herramienta utilizada en este caso es el ionóforo de Ca^{2+} A23187, un transportador de iones móvil que forma complejos estables con cationes divalentes. Este compuesto une Ca^{2+} y, luego de atravesar la membrana plasmática, lo libera en el interior de la célula eucariota. Se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico. A 240 o a 300 min p.i., según se indica, se realizó un pulso de 10 min con el ionóforo de Ca^{2+} A23187. Luego de 10 min, se determinaron las UFC extracelulares correspondientes a las bacterias que egresaron en ese lapso de tiempo.

El egreso de la cepa silvestre no fue afectado por el tratamiento con el ionóforo, mientras que el egreso de la cepa mutante *shIBA* aumentó un 97% (pulso a 240 min p.i., Figura

V.8A) o un 156% (pulso a 300 min p.i., Figura V.8B), en comparación con la condición sin tratar. Estos resultados indican que el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ocasionado por la acción del ionóforo permite restablecer el valor de UFC extracelulares a un valor equivalente al obtenido para la cepa silvestre.

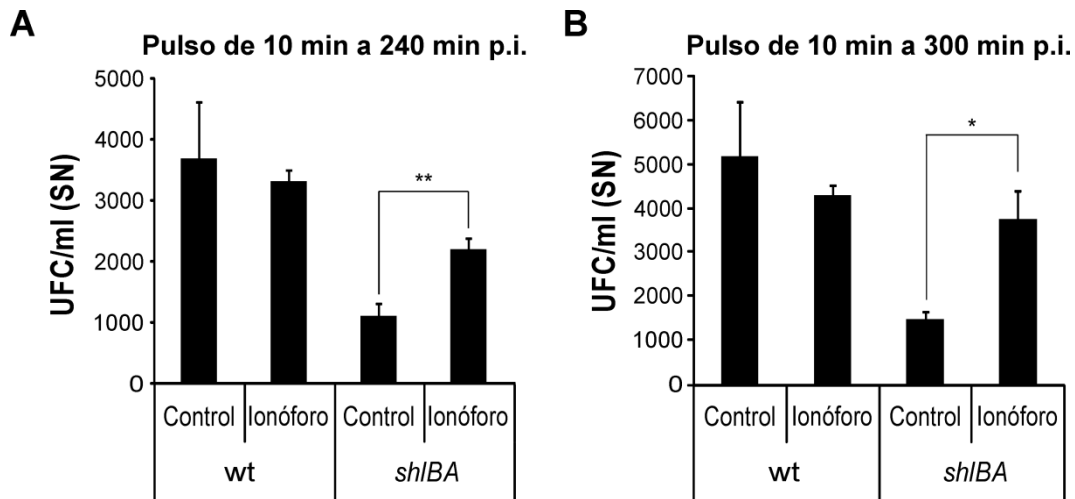


Figura V.8. Ensayos de egreso en presencia del ionóforo de Ca^{2+} A23187. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante en *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a **A)** 240 min p.i. o **B)** 300 min p.i., el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con 20 μM A23187. Luego de un pulso de 10 min, se realizó un recuento de UFC extracelulares. Se calcularon las UFC en sobrenadante (SN) por ml. Se indican los promedios \pm S.D. para cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control para cada cepa.

Previamente, se demostró que un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular es suficiente para estimular la exocitosis lisosomal en varios tipos celulares, incluyendo la línea celular CHO (208). La liberación de la enzima β -hexosaminidasa, normalmente contenida en el cargo lisosomal, se describió como un buen marcador para evaluar eventos exocíticos (208). Para verificar la acción del ionóforo A23187 y del quelante BAPTA-AM sobre el mecanismo exocítico en células CHO, se realizaron ensayos de liberación de β -hexosaminidasa detectando la actividad enzimática con el sustrato 4-metil-umberiferil-N-acetil- β -D-glucosaminida. Para ello, se trataron células CHO no invadidas durante 10 min con A23187 o 120 min con BAPTA-AM. Luego del tratamiento, se recuperó el sobrenadante de cultivo para la detección de β -hexosaminidasa y la monocapa celular para realizar una inmunodetección de α -tubulina, como control de la cantidad de células analizadas en el ensayo enzimático.

Como se puede ver en la Figura V.9A, el tratamiento con el ionóforo aumentó 6,98 veces la actividad enzimática de β -hexosaminidasa detectada en sobrenadante, sugiriendo que el ionóforo incrementa la exocitosis lisosomal. La actividad β -hexosaminidasa obtenida en las células tratadas con BAPTA-AM es 0,52 veces la actividad obtenida en el control, sugiriendo que el tratamiento realizado con BAPTA-AM reduce la exocitosis lisosomal. Estos resultados permiten corroborar que las drogas utilizadas tienen el efecto esperado sobre las células CHO.

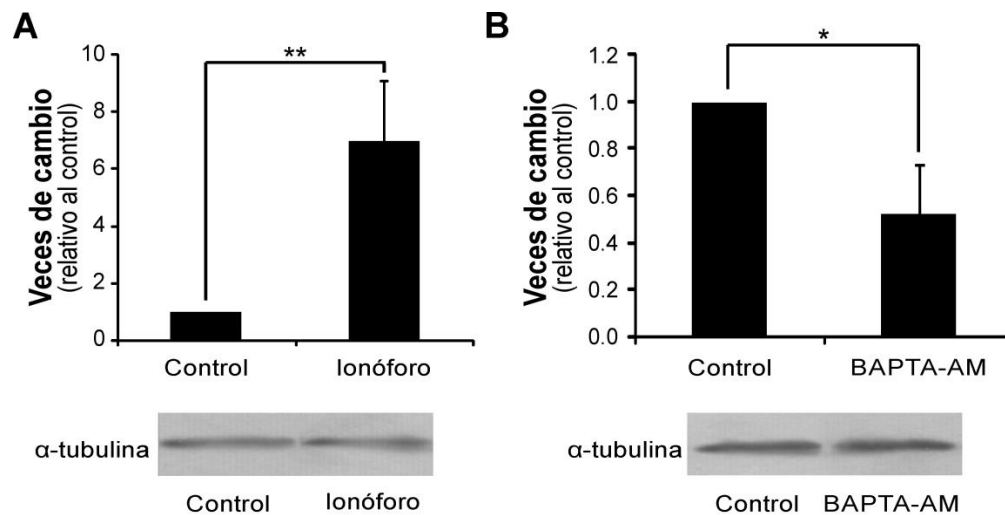


Figura V.9. Ensayos de liberación de β -hexosaminidasa. Se incubaron células CHO no invadidas con **A)** 20 μ M A23187 por 10 min o **B)** 40 μ M BAPTA-AM por 120 min. Luego del tratamiento, se recuperaron los sobrenadantes de cultivos para evaluar la actividad β -hexosaminidasa (panel superior) y la monocapa celular para realizar una inmunodetección de α -tubulina (panel inferior). Se calcularon las veces de cambio en la actividad de β -hexosaminidasa relativo al control. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). En la parte inferior de la figura se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de α -tubulina.

Considerando que las organelas son reservorios intracelulares de Ca^{2+} (207) y que la hemolisina ShIA es una PFT, se examinó si la membrana de la SeCV se encuentra alterada en su permeabilidad. Se planteó la hipótesis de que esta permeabilización podría ser responsable del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular localizado en las cercanías de la SeCV, detectado previamente (Figura V.5). Los β -galactósidos se localizan en la cara luminal de la membrana vacuolar, pero son expuestos al citosol frente al daño vacuolar. Gracias a la gran afinidad de unión que posee por los β -galactósidos, la galectina-8 se postula como un reportero de daño vacuolar extremadamente útil (188). Con el fin de evaluar si existe daño a la membrana vacuolar ocasionado por *Serratia* en los tiempos que se detecta el egreso bacteriano, se realizaron ensayos de co-localización con galectina-8. Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO que expresan de forma transitoria una fusión de galectina-8 a la proteína YFP (del inglés *yellow fluorescent protein*). A 120, 240 y 360 min p.i., se fijaron las células invadidas y se realizó una inmunodetección indirecta de las bacterias intracelulares. Se capturaron las imágenes por microscopía confocal.

Un alto porcentaje de co-localización de las SeCV con galectina-8 indica que existe daño en la membrana de la vacuola que contiene a *Serratia*. Como se puede ver en la Figura V.10, no se detectan diferencias significativas en los porcentajes de co-localización de galectina-8 con la wt-SeCV o con la *shIBA*-SeCV a 120 o 240 min p.i. (Figura V.10A). Sin embargo, a 360 min p.i., la co-localización con galectina-8 aumento 2,5 veces en la wt-SeCV en comparación con el valor obtenido para la *shIBA*-SeCV (Figura V.10A). En las imágenes mostradas (Figura V.10B) se pueden observar las diferencias obtenidas entre la distribución citoplásmica de galectina-8 en células no invadidas o invadidas con la mutante *shIBA* y el

reclutamiento de galectina-8 a la SeCV que se produce en células invadidas con la cepa silvestre. Este resultado indica que *Serratia* es capaz de alterar la permeabilidad vacuolar de un modo dependiente de ShIA.

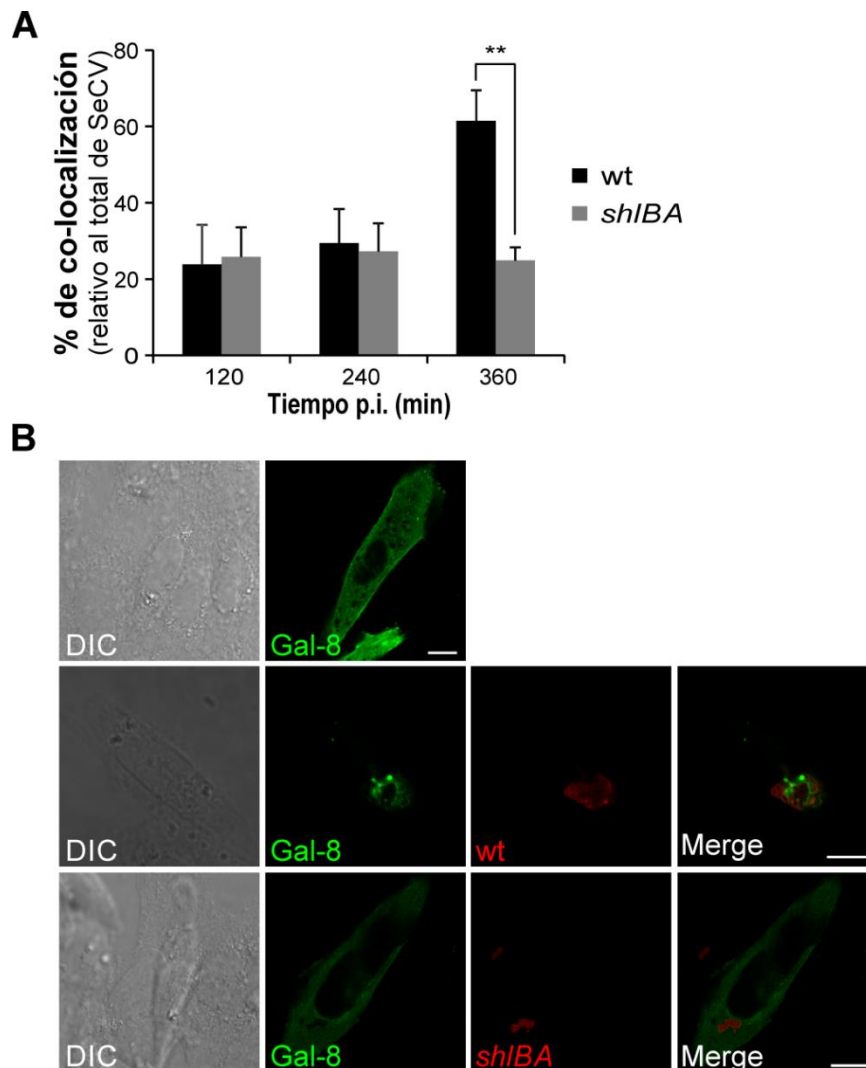


Figura V.10. Ensayo de co-localización con galectina-8. Se infectaron células CHO que expresan de forma transitoria una fusión del YFP-galectina-8 (Gal-8, fluorescencia verde) con la cepa silvestre (wt, fluorescencia roja) o mutante *shIBA* (fluorescencia roja). Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a los tiempos indicados se fijaron las muestras. Las bacterias intracelulares se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-*Serratia* (fluorescencia roja). **A**) Se calculó el porcentaje de SeCV que co-localiza con galectina-8 relativo al total de SeCV. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos (** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor obtenido para la cepa silvestre para cada tiempo. **B**) Se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal. Barras: 10 μ M.

Como se mencionó previamente, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró en su Tesis Doctoral que el mecanismo de egreso de *Serratia* no involucra un paso por el citosol de la célula hospedadora. Por lo tanto, se puede inferir que el daño ocasionado a la SeCV no sería con fines de escapar al citosol. Se puede formular la hipótesis de que los poros generados por ShIA en la membrana vacuolar permitirían la liberación de Ca^{2+} desde el lumen vacuolar hacia el citosol, disparando el mecanismo exocítico. En contraposición, la mutante *shIBA*, que no posee una hemolisina funcional, no es capaz de ocasionar la liberación de Ca^{2+} desde el

interior de la vacuola.

Considerando esta información y con el fin de evaluar si el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular puede recuperar el defecto en el egreso de la mutante *shIBA*, se realizaron ensayos de invasión en presencia de una cepa de *E. coli* que expresa, secreta y activa ShIA. Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 de la cepa mutante *shIBA* y a 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con una cepa de *E. coli* W3110 que expresa sólo *shIA* o el operón *shIBA*. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares y a la monocapa celular se le agregó el compuesto MTT, para evaluar citotoxicidad.

La cepa de *E. coli* W3110/*pshIA* no es hemolítica, ya que no expresa *shIB*, el transportador y activador de ShIA. Es importante mencionar que las cepas utilizadas de *E. coli* no son invasivas. Por lo tanto, el efecto que se pueda observar por la expresión de ShIA, se debe a la acción de la hemolisina desde el medio extracelular. ShIA podría insertarse en la membrana externa y llevar a cabo sus efectos desde ahí o podría ser endocitada y, mediante el tráfico normal de la célula eucariota, llegar a la membrana de alguna organela. Como se demostró previamente, la cepa mutante en *shIBA* no posee la capacidad de egresar de la célula invadida y, por lo tanto, se acumula intracelularmente. Al agregar la cepa *E. coli* W3110/*pshIBA*, se revierte el fenotipo ya que se obtiene un incremento de 3,82 veces en las UFC extracelulares al comparar con el control (sin el agregado de *E. coli*, Figura V.11A). Como era predecible, el agregado de *E. coli* W3110/*pshIA*, no tuvo ningún efecto sobre el egreso de la mutante *shIBA* en comparación con el control (Figura V.11A). Estos resultados indican que la expresión de ShIA desde el medio extracelular permite una movilización de Ca^{2+} que promueve el egreso de la cepa mutante *shIBA*.

Considerando que ShIA es citotóxica y para descartar que el aumento en las UFC extracelulares se deba a la lisis de las células eucariotas, se realizaron ensayos de reducción de MTT, para evaluar citotoxicidad. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. El resultado de este ensayo permite concluir que el agregado *E. coli* W3110/*pshIBA* no es citotóxico para las células eucariotas, en las condiciones ensayadas (Figura V.11B).

Estos resultados implican que no es necesaria la invasión para que ShIA pueda tener efecto. Se pueden postular dos modelos para explicarlo: a) que ShIA tiene sus efectos sobre la membrana plasmática o b) que ShIA luego de insertarse en la membrana plasmática pueda traficar y residir en membranas de otras organelas. Serán necesarios realizar estudios adicionales para poder discernir entre ambas posibilidades.

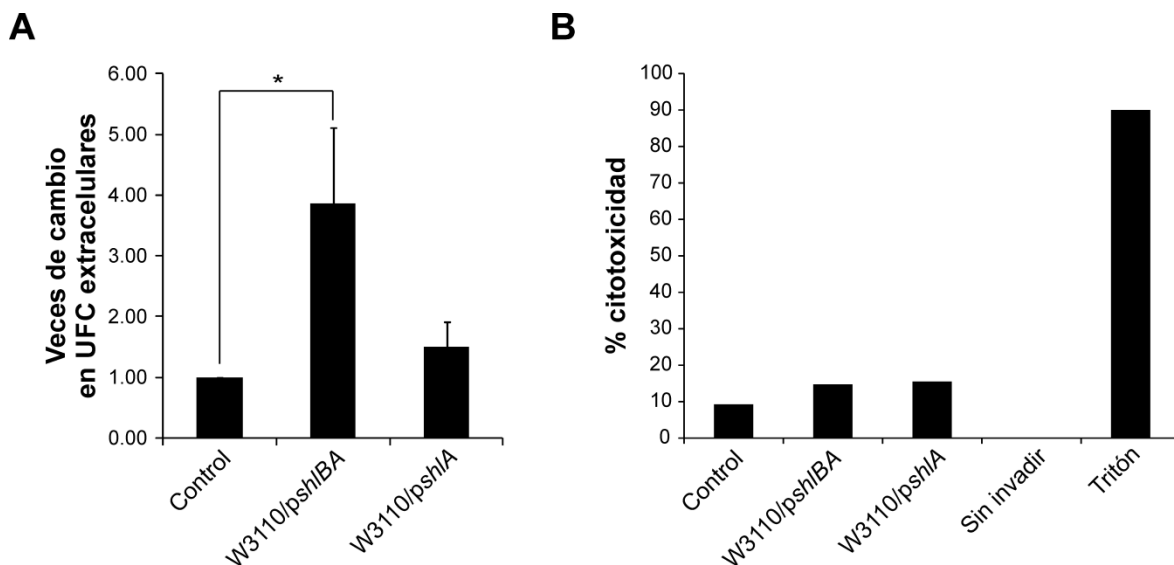


Figura V.11. Ensayos de egreso en presencia de una cepa de *E. coli* que expresa ShIA. Se infectaron células CHO con la cepa mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico y *E. coli* W3110/*pshIBA* o *E. coli* W3110/*pshIA*, si es indicado. **A)** A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos (* $p < 0,05$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control. **B)** A 360 min p.i., se lavaron las células y se agregó MTT. Luego de la incubación, se disolvieron los cristales de formazán y se midió absorbancia a 570 nm y 630 nm. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo.

V.2.4. Rol de la acidificación vacuolar en el egreso de *Serratia*

A tiempos tardíos en la infección, las SeCV son vacuolas predominantemente no ácidas y no degradativas, con características de autofosoma (20, 22). Previamente, se reportó que otras bacterias patógenas requieren la presencia de bajo pH para el crecimiento intracelular. Además, se reportó que al tratar células invadidas con un inhibidor de la ATPasa vacuolar (vH^+ -ATPasa), *L. monocytogenes* pierde la capacidad de escapar de los autofosomas (209).

Con el fin de evaluar la influencia de la vH^+ -ATPasa y del pH vacuolar en el egreso y la replicación intracelular de *Serratia*, se realizaron ensayos de invasión en presencia de bafilomicina A1 (inhibe la vH^+ -ATPasa) o NH_4Cl (neutraliza el pH vacuolar). Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico. A 360 min p.i., se determinaron las UFC intracelulares y extracelulares. Se agregó bafilomicina A1 o NH_4Cl a 60, 120 o 240 min p.i., según se indica en cada caso. Además, se recuperaron las UFC intracelulares de pocillos sin tratar a los tiempos indicados (120, 240 y 360 min p.i.).

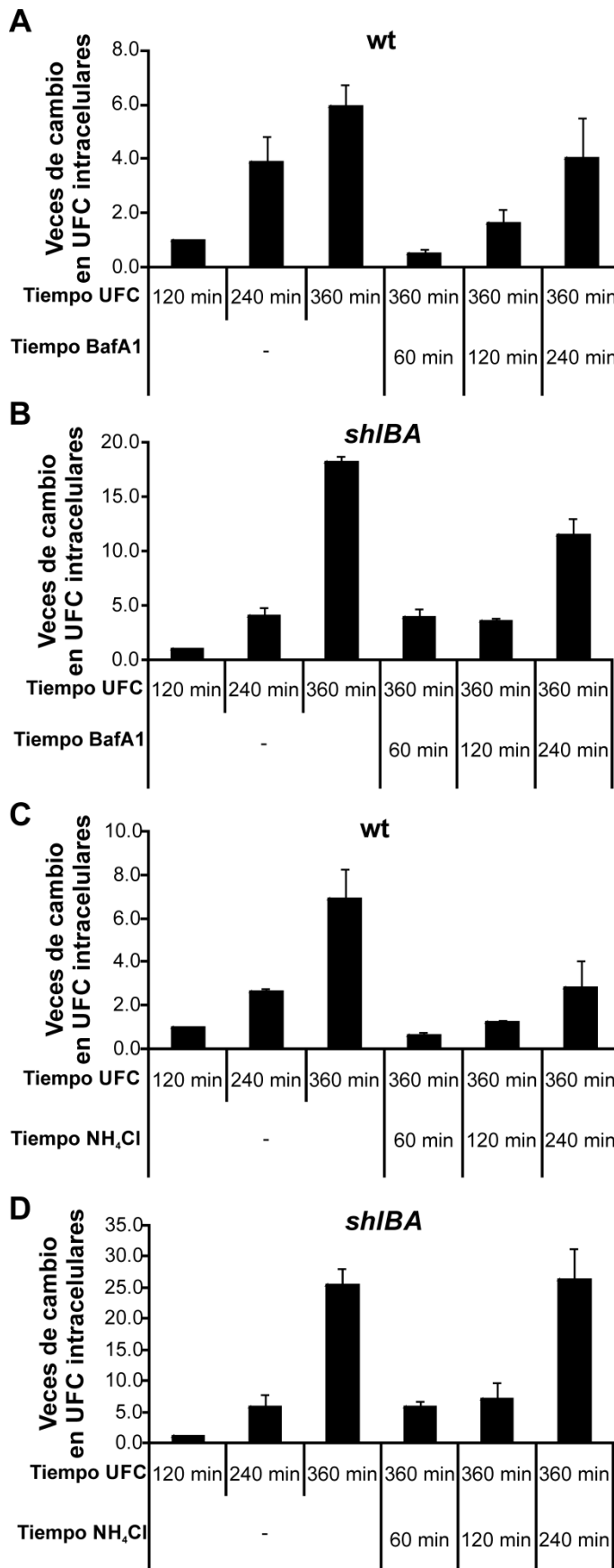


Figura V.12. Ensayos de protección a gentamicina en presencia de inhibidor de la vH⁺-ATPasa o neutralizante del pH vacuolar. Se infectaron células CHO con la cepa **A y C)** silvestre (wt) o **B y D)** mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A los tiempos indicados p.i. (Tiempo UFC) se determinaron las UFC intracelulares. A los tiempos indicados p.i. (Tiempo BafA1 o Tiempo NH₄Cl), se agregó **A y B)** 100 nM bafilomicina A1 (BafA1) o **C y D)** 10 mM NH₄Cl. Las veces de cambio en UFC intracelulares se calcularon considerando las UFC recuperadas a 120 min p.i. como la unidad. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos independientes.

Llamativamente, la replicación de *Serratia* se detuvo luego del agregado de bafilomicina A1 o de NH₄Cl (Figura V.12). Es decir, al agregar la droga a 120 min p.i. y recuperar las UFC a 360 min p.i. se obtiene una cantidad de UFC aproximadamente equivalente a las UFC que

hubiéramos recuperado a 120 min p.i. Eso mismo pasa agregando las drogas a 60 o 240 min p.i. Si bien hay un patrón ligeramente diferente, no se observan grandes diferencias entre los fenotipos obtenidos frente al agregado de las drogas al comparar la cepa silvestre y la mutante *shIBA* (Figura V.12). En su Tesis Doctoral, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que el tratamiento con bafilomicina A1 o con NH_4Cl no afecta el crecimiento de *S. marcescens* en medio LB, por lo tanto se puede descartar que la reducción en las UFC se deba a un problema de crecimiento del patógeno por la acción de las drogas utilizadas. Estos resultados indican que, al menos en el período de tiempo ensayado, una vH^+ -ATPasa funcional y/o la presencia de compartimentos intracelulares ácidos son requeridos para la correcta progresión de la SeCV. También es importante destacar que los resultados revelan que este fenotipo es independiente de ShIA.

Previamente, se reportó que las drogas que afectan el pH intracelular previenen la maduración de las vacuolas al inhibir la fusión entre endosomas tempranos y tardíos o endosomas tardíos y lisosomas (210, 211). Considerando que las SeCV tienen características de autofagosoma, se puede postular que el fenotipo observado está relacionado con la imposibilidad de que la SeCV madure, al frenar el tráfico normal de la célula eucariota.

Independientemente del resultado obtenido en la Figura V.13, el egreso de *Serratia* (representado como la relación entre las UFC recuperadas de sobrenadante y las intracelulares a 360 min p.i.) no se vio afectado por el tratamiento con bafilomicina A1 o NH_4Cl (Figura V.13). Este último resultado sugiere que una vH^+ -ATPasa funcional y/o la presencia de compartimentos intracelulares ácidos son dispensables para el egreso de *Serratia*.

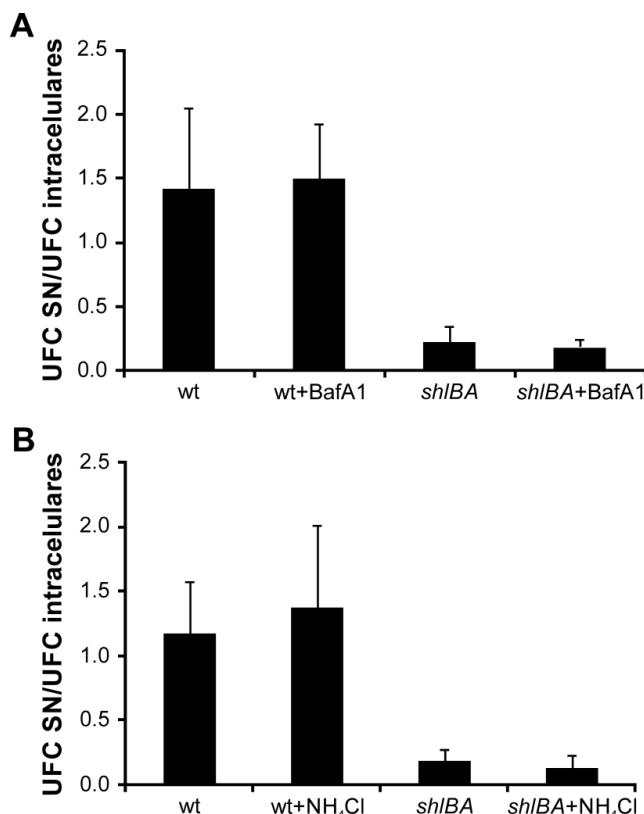


Figura V.13. Ensayos de egreso en presencia de inhibidor de la vH^+ -ATPasa o neutralizante del pH vacuolar. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con **A)** 100 nM bafilomicina A1 (BafA1) o **B)** 10 mM NH_4Cl . A 360 min p.i., se recuperaron las UFC extracelulares e intracelulares. Se calculó la relación entre las UFC extracelulares (SN) y las UFC intracelulares. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes

V.3. DISCUSIÓN

En este capítulo de Tesis, se demostró que luego de replicar dentro de la SeCV, *S. marcescens* lleva a cabo un mecanismo de egreso al medio extracelular de un modo dependiente de la hemolisina ShIA. De hecho, una mutante en *shIBA* se encuentra retenida en la vacuola, siendo incapaz de escapar. También se demostró que el proceso de egreso es no lítico, ya que se conserva la viabilidad y la integridad de la célula hospedadora, y que las bacterias que llegan al medio extracelular no están rodeadas de membrana eucariota, excluyendo los mecanismos mediados por exosomas.

Previamente, se reportó que en todas las células eucariotas, sean secretorias o no secretorias, un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular induce eventos exocíticos (206). Los resultados mostrados en este capítulo demuestran que, a los tiempos en los que se detecta el egreso, *Serratia* silvestre, pero no la mutante *shIBA*, es capaz de inducir un aumento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular localizado cerca de la SeCV. Además, se demostró que provocando un pico de Ca^{2+} intracelular de forma farmacológica, se restaura el egreso de la cepa mutante *shIBA* a niveles equivalentes a los obtenidos para la cepa silvestre. En concordancia con estos resultados, el secuestro del Ca^{2+} citosólico impidió el egreso de la cepa silvestre, pero no tuvo efecto sobre la cepa mutante *shIBA*.

Estos resultados en conjunto permiten postular un modelo en el cual mediante la expresión de ShIA, *Serratia* induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular localizada en la cercanía de la SeCV. Esta movilización de Ca^{2+} es necesaria para llevar a cabo un mecanismo de egreso no lítico y de tipo exocítico. En ausencia de ShIA, no hay movilización de Ca^{2+} intracelular y por lo tanto la mutante es incapaz de egresar. Sin embargo, si se estimula farmacológicamente la movilización de Ca^{2+} , la cepa mutante *shIBA* adquiere la capacidad de egresar de la célula invadida.

Los resultados mostrados aquí también demuestran que el agregado de EGTA evita el egreso de la cepa silvestre, sugiriendo que el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular podría disparar la salida del patógeno. Sin embargo, se reportó que el secuestro del Ca^{2+} extracelular con EGTA depleta rápidamente el Ca^{2+} citosólico, causando el arresto de las oscilaciones de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares (212). Por lo tanto, a partir de nuestros resultados no se puede discernir si el egreso de *Serratia* se debe a una movilización de Ca^{2+} desde compartimentos internos o si es resultado de un influjo desde el medio extracelular. Nosotros nos inclinamos a favor de la hipótesis de que el origen del Ca^{2+} es primordialmente intracelular porque: a) se requieren altas concentraciones de EGTA para inhibir el egreso, b) el BAPTA-AM, que sólo secuestra el Ca^{2+} intracelular, impide la salida del patógeno y c) el incremento en la concentración de Ca^{2+} detectado con Fluo-3 AM se encuentra localizado en la cercanía de la SeCV. Además, dado que las vacuolas intracelulares son consideradas reservorios de Ca^{2+} , se puede especular que la alteración de la permeabilidad de la membrana vacuolar ocasionada por ShIA (y evidenciada como un reclutamiento de galectina-8) podría ser responsable del

eflujo de Ca^{2+} desde el lumen vacuolar.

En su período post-doctoral, la Dra. Gisela Di Venanzio demostró que la inhibición de la polimerización de actina utilizando citocalisina D bloquea el egreso de *Serratia* (145), indicando que hay una modulación de la dinámica de actina dependiente de ShIA que está directamente relacionada con el proceso de egreso bacteriano. Interesantemente, en contraste a la cepa silvestre, la replicación sumada a la retención intravacuolar de la mutante *shIBA*, genera una SeCV muy grande (por el impedimento en el mecanismo de egreso) que co-localiza con actina (145). Estos resultados sugieren dos roles del citoesqueleto de actina en el egreso de *Serratia*: a) puede polimerizar y depolimerizar dinámicamente alrededor de la SeCV en respuesta a la señal intracelular de Ca^{2+} ocasionada por ShIA y b) puede participar en la exocitosis de la SeCV al acercar las vacuolas a la membrana plasmática estimulando los eventos de fusión de membranas. La expansión anómala y no fisiológica de las *shIBA*-SeCV las ubica en estrecho contacto con la membrana plasmática. En esta situación, la depolimerización del citoesqueleto de actina sería suficiente para ocasionar la exocitosis. Además, en ausencia de ShIA, un incremento en la concentración de Ca^{2+} causado farmacológicamente promueve una redistribución de actina y el egreso de la cepa mutante. Este resultado refuerza la relación entre el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ocasionado por ShIA y los rearrreglos del citoesqueleto de actina. En conjunto, estos resultados permiten postular un modelo en el cual ShIA induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que activa rearrreglos en el citoesqueleto de actina. El movimiento mediado por actina acerca a la SeCV a la membrana plasmática donde se fusionan y se produce el descargo exocítico del de la vacuola al medio extracelular.

En el laboratorio se reportó que *Serratia* prolifera en vacuolas no ácidas y no degradativas con características de autofagosoma (20, 22). Aunque *S. marcescens* utiliza o promueve alguna estrategia para neutralizar el pH intravacuolar, en este capítulo se demostró que la inhibición de la vH^+ -ATPasa o la neutralización del pH frenan la progresión de la SeCV a distintos tiempos. Otros grupos de trabajo han reportado que los tratamientos con bafilomicina A1 o con NH_4Cl afectan el tráfico de la célula eucariota, impidiendo la fusión entre endosomas tempranos y tardíos o endosomas tardíos y lisosomas (210, 211). Teniendo en cuenta que las SeCV tienen características de autofagosoma, se podría relacionar el fenotipo observado con un arresto en la maduración de la SeCV producido al alterar el tráfico normal de la célula hospedadora.

Previamente, utilizando modelo de virulencia *in vivo*, se reportó que las cepas de *Serratia* que no expresan ShIA se encuentran fuertemente atenuadas (15, 18, 140, 213). Los resultados obtenidos en este capítulo permiten postular la hipótesis que dicha deficiencia pueda ser atribuida a la incapacidad que poseen esas cepas de diseminarse dentro del hospedador.

Finalmente, estos resultados revelan una estrategia desarrollada por *Serratia* para

subvertir el tráfico vacuolar de la célula hospedadora y egresar de la célula epitelial invadida. Los resultados mostrados también destacan la importancia de ShIA como un blanco crítico para combatir las infecciones causadas por *Serratia* y permiten postular un nuevo rol de las PFTs, demostrando que pueden funcionar como un efector intracelular que induce un mecanismo de egreso de tipo exocítico y no lítico.

V.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el segundo capítulo de esta Tesis permiten formular las siguientes conclusiones:

- La hemolisina ShIA es el factor responsable del egreso de *S. marcescens* luego de invadir células no fagocíticas.
- El mecanismo de egreso llevado a cabo por *Serratia* es no lítico, ya que no se detectan alteraciones en la viabilidad celular ni en la integridad de la membrana plasmática.
- *Serratia* no egresa rodeada de membranas, por lo tanto no realiza un mecanismo de egreso de tipo extrusión.
- *S. marcescens* provoca un aumento localizado en la concentración de Ca^{2+} intracelular, de un modo dependiente de ShIA. Este aumento se localiza en la cercanía de la SeCV.
- El Ca^{2+} es indispensable en el proceso de egreso de *Serratia*, sugiriendo que el mecanismo de egreso es de tipo exocítico.
- *Serratia* es capaz de alterar la permeabilidad de la SeCV, de un modo dependiente de ShIA.
- Una vH^+ -ATPasa funcional y/o la presencia de compartimentos intracelulares ácidos son requeridos para la correcta progresión de la SeCV, pero no para el egreso de *Serratia*.

VI. Capítulo III. Inhibición de la toxina formadora de poros ShIA.

VI.1. INTRODUCCIÓN

Las PFTs son muy comunes en bacterias patógenas e incluyen más del 30% de las proteínas citotóxicas bacterianas (214), por lo tanto el estudio de las mismas es un foco muy importante de investigación. Las PFTs pueden permeabilizar membranas eucariotas, tanto la membrana plasmática como las membranas de organelas, promoviendo el eflujo o influjo de iones, pequeñas moléculas y proteínas. Si bien algunas PFTs pueden causar la muerte celular, a dosis sub-líticas inducen respuestas celulares pleiotrópicas, incluyendo reparación de la membrana plasmática y cambios metabólicos (215, 216).

Previamente, se reportó que las células mantienen una concentración de Ca^{2+} intracelular cercana a 100 nM (217). En contraste, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, los endosomas, los autofagosomas y los lisosomas presentan concentraciones lumenales en el rango micromolar y milimolar, por lo tanto se pueden considerar reservorios de Ca^{2+} (218). Las PFTs son capaces de modificar la concentración de Ca^{2+} intracelular, regulando procesos eucariotas como la adhesión o muerte celular (215). Los poros formados por las PFTs presentan mayor o menor selectividad dependiendo de la naturaleza de la proteína y de su concentración: se reportó que diversas PFTs presentan una menor selectividad a altas concentraciones de la toxina (219). Los poros formados por las CDCs son no selectivos y causan un influjo de Ca^{2+} masivo, que resulta en varias respuestas de la célula eucariota como la reparación de la membrana dañada, la liberación de citoquinas y la muerte celular (216, 220). Las toxinas de la familia RTX forman poros más pequeños y con una mayor selectividad que las CDCs, por lo tanto inducen oscilaciones transitorias en la concentración de Ca^{2+} y desde reservorios intracelulares (216, 221).

La hemolisina ShIA es considerada uno de los factores de virulencia principales de *S. marcescens*. Se demostró que ShIA es necesaria para la citotoxicidad de *Serratia* en distintas líneas celulares y que puede formar poros en eritrocitos, fibroblastos y células epiteliales. A concentraciones sub-líticas, induce un eflujo de K^+ y depleción de ATP. A concentraciones mayores, es citotóxica (15, 147).

En el capítulo II se demostró que, mediante la expresión de ShIA, *Serratia* produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular localizado en la cercanía de la SeCV. Esta movilización de Ca^{2+} es necesaria para llevar a cabo un mecanismo de egreso no lítico y de tipo exocítico. En ausencia de ShIA, no hay movilización de Ca^{2+} intracelular y por lo tanto la cepa mutante *shIBA* es incapaz de egresar. Considerando que las vacuolas son reservorios de Ca^{2+} , se pueden postular dos hipótesis acerca del mecanismo de acción de ShIA: a) que la hemolisina se inserta en la membrana eucariota permitiendo el pasaje de iones a través de su poro o b) que ShIA modula la actividad de un canal de Ca^{2+} eucariota. En este capítulo de Tesis se propone comprender el mecanismo de acción de ShIA.

VI.2. RESULTADOS

VI.2.1. Rol de los canales de Ca^{2+} eucariotas en el mecanismo de egreso de *Serratia*

En la introducción de este capítulo, se formularon dos hipótesis sobre el mecanismo de acción de ShIA: que actúe como un canal de Ca^{2+} o que module la actividad de un canal de Ca^{2+} eucariota. Considerando que los canales de Ca^{2+} eucariotas de tipo T están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son inhibidos por Ni^{2+} (222–225), se evaluó si el egreso de *Serratia* se bloquea al agregar distintas concentraciones de NiCl_2 . Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min p.i., se agregó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de NiCl_2 . A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares e intracelulares. Como se mencionó previamente, una reducción en las UFC extracelulares acompañada de un aumento en las UFC intracelulares indica un bloqueo en el mecanismo de egreso de *Serratia*.

Como se puede ver en la Figura VI.1A, la adición de 1 mM NiCl_2 ocasionó una reducción del 60% en las UFC extracelulares, mientras que las concentraciones menores ensayadas no afectaron el egreso bacteriano. Al examinar las UFC intracelulares, se puede observar que el agregado de NiCl_2 produjo un incremento del 84% (Figura VI.1B). Este resultado demuestra que el Ni^{2+} inhibe el egreso de *Serratia*, probablemente a través de un impedimento en la movilización de Ca^{2+} , y sugiere que: a) el Ni^{2+} bloquea a ShIA como el poro por el que pasan los iones o b) el Ni^{2+} bloquea un canal de Ca^{2+} eucariota que es modulado por ShIA.

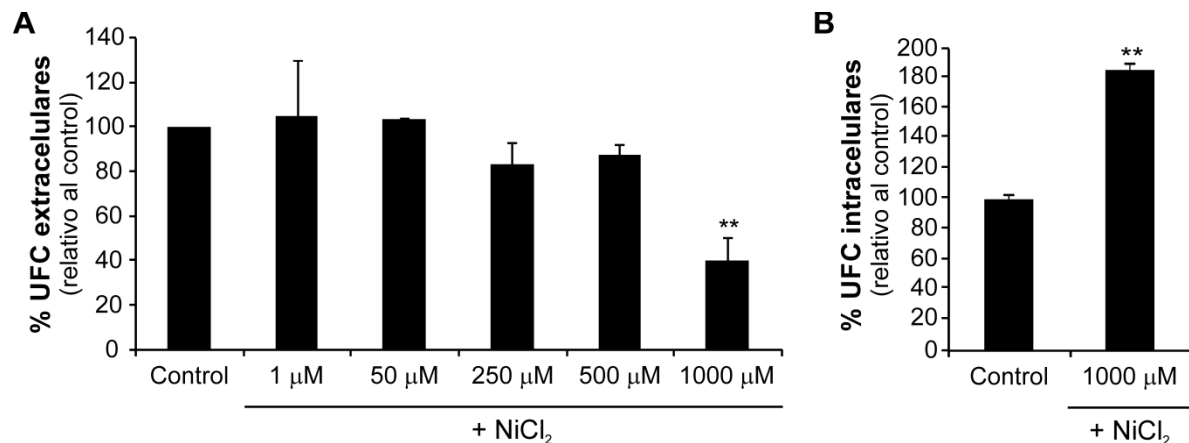


Figura VI.1. Ensayo de egreso en presencia de NiCl_2 . Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de NiCl_2 . A 360 min p.i., se determinaron las UFC **A)** extracelulares y **B)** intracelulares. Se calcularon los porcentajes de UFC considerando el control sin tratar como el 100%. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor del control sin tratar.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje pueden dividirse en dos categorías: LVA (del inglés *low-voltage activated*) y HVA (del inglés *high-voltage activated*), siendo activados por pequeñas o grandes despolarizaciones de membrana, respectivamente. Se reportó que un tipo específico de canales LVA, denominados $\text{Ca}_v3.2$, son particularmente sensibles al Ni^{2+} , siendo

inhibidos por concentraciones menores a 10 μM (222, 225). Considerando que el egreso de *Serratia* sólo se inhibe a la concentración 1000 μM se puede inferir que los canales $\text{Ca}_v3.2$ no estarían involucrados en la salida del patógeno.

Previamente, se reportó que la droga mibefradil actúa como un inhibidor de los canales LVA y HVA, presentando una mayor afinidad por los LVA. Por lo tanto, los LVA son inhibidos por bajas concentraciones de mibefradil, mientras que las concentraciones mayores inhiben también los HVA (226, 227). Para evaluar si los LVA o HVA están involucrados en el mecanismo de egreso de *Serratia*, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una $\text{MOI}=10$ y a 240 min se agregó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de mibefradil. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares.

La adición de mibefradil en las concentraciones ensayadas no produjo una modificación en las UFC extracelulares (Figura VI.2). Se ensayó también el efecto de concentraciones mayores a 30 μM , pero dicho tratamiento dañó la monocapa de células epiteliales. Este resultado indica que los HVA y los LVA no estarían involucrados en el egreso de *S. marcescens*. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede inferir que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje no están involucrados en la salida de *Serratia*.

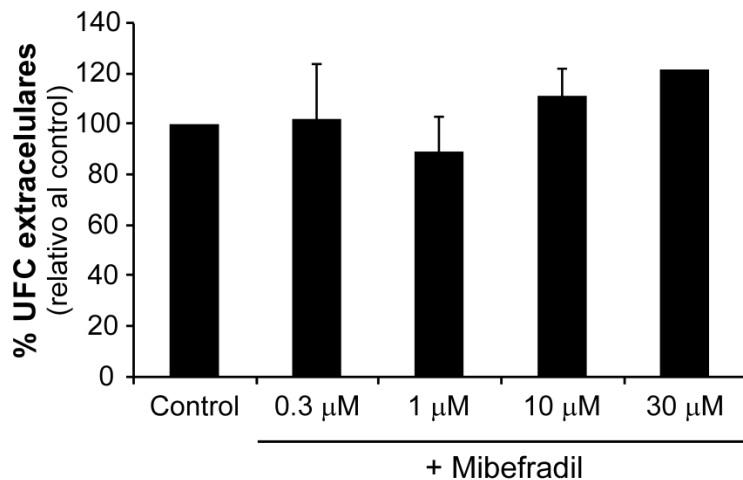


Figura VI.2. Ensayo de egreso en presencia de mibefradil. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una $\text{MOI}=10$. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de mibefradil. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares. Se calcularon los porcentajes de UFC extracelulares considerando el control sin tratar como el 100%. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes.

La concentración de Ca^{2+} intracelular puede aumentar liberando el ión desde reservorios intracelulares o ingresando desde el medio extracelular por medio de canales que se encuentran en la membrana plasmática de todas las células no excitables, denominados SOC (del inglés *store-operated channels*). Algunos reservorios intracelulares son sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y se reportó que el 2-aminoetoxidifenil-borato (2-APB) modula los receptores de IP_3 , inhibiendo la liberación de Ca^{2+} desde dichos reservorios (228, 229). Además, se reportó que actúa como un inhibidor de los SOC, impidiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (230, 231). Para evaluar si los reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP_3 o los SOC están involucrados en el mecanismo de egreso de *Serratia*, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una $\text{MOI}=10$ y a 240 min p.i., se agregó medio

de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de 2-APB. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares e intracelulares.

El agregado de 2-APB no produjo una alteración en el porcentaje de UFC extracelulares ni intracelulares, indicando que no afecta la salida de *Serratia* (Figura VI.3). Este resultado sugiere que los reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP_3 y los SOCs no están involucrados en el mecanismo de egreso de *S. marcescens*.

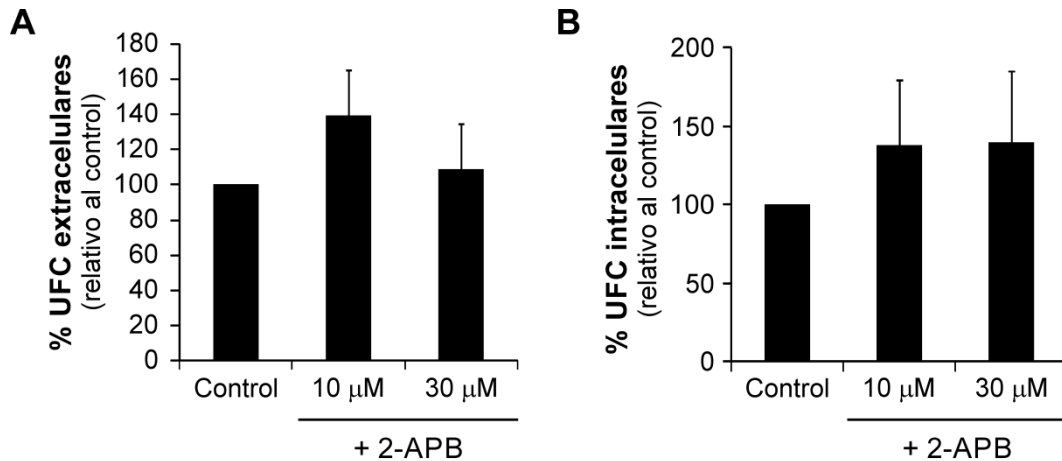


Figura VI.3. Ensayo de egreso en presencia de 2-APB. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de 2-APB. A 360 min p.i., se determinaron las UFC **A)** extracelulares y **B)** intracelulares. Se calcularon los porcentajes de UFC considerando el control sin tratar como el 100%. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes.

La tapsigargina es un inhibidor de la bomba SERCA (del inglés *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -*ATPase*) y produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, al bloquear la capacidad de la célula de bombear el ión hacia el interior del retículo sarcoplasmático/endoplasmático. El vaciamiento del retículo puede activar secundariamente SOCs, permitiendo un influjo de Ca^{2+} hacia el citosol (232). Para examinar si la bomba SERCA está involucrada en el mecanismo de egreso de *Serratia*, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y a 240 min se agregó medio de cultivo libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de tapsigargina. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares e intracelulares. En este caso, se determinaron también las UFC intracelulares ya que la tapsigargina puede inhibir la fusión de autofagosomas con lisosomas y, por lo tanto, afectar la progresión de la SeCV. Considerando que la tapsigargina produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y que en el capítulo II se demostró que al aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular por acción de un ionóforo, la cepa mutante *shIBA* adquiere la capacidad de egresar, se ensayó el efecto de la droga sobre la mutante *shIBA*.

El agregado de tapsigargina no afectó la salida de la cepa silvestre ni de la mutante *shIBA* (Figura VI.4). Por lo tanto, se puede inferir que la bomba SERCA no tendría un rol en el mecanismo de egreso de *Serratia*.

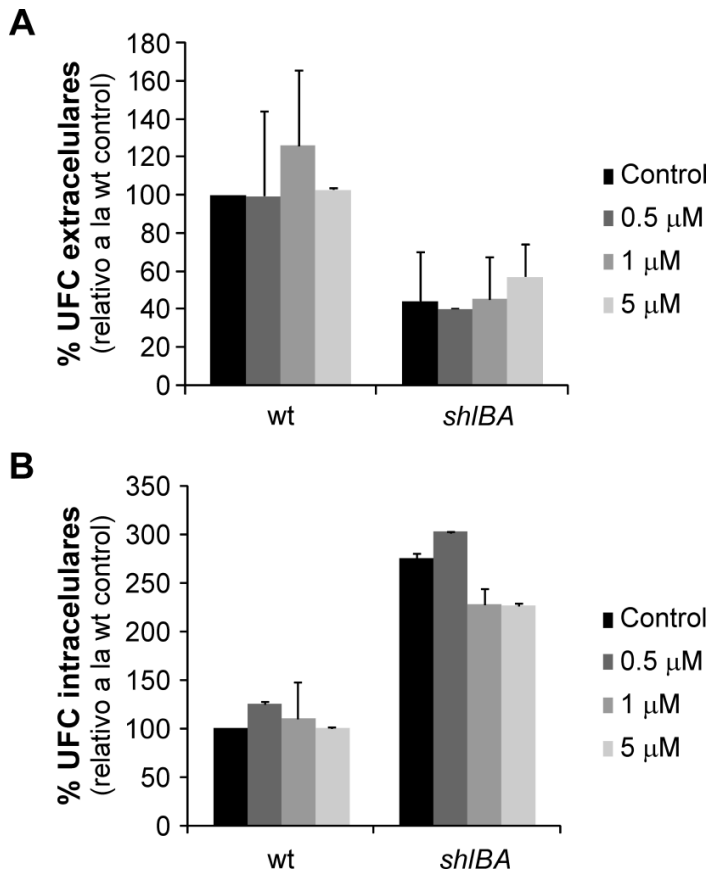


Figura VI.4. Ensayo de egreso en presencia de tapsigargina. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shIBA* con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio libre de antibiótico suplementado con las concentraciones indicadas de tapsigargina. A 360 min p.i., se determinaron las UFC **A)** extracelulares y **B)** intracelulares. Se calcularon los porcentajes de UFC considerando el valor obtenido para la cepa silvestre sin tratar como el 100%. Se indican los promedios \pm S.D. para tres experimentos independientes.

En resumen, todos los inhibidores de canales de Ca^{2+} ensayados no afectaron el egreso de *Serratia*. Esto indica que los canales dependientes de voltaje, los SOCs, la bomba SERCA y los reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP_3 no estarían involucrados en el mecanismo de salida del patógeno. Sin embargo, es importante recordar que la adición de Ni^{2+} produjo una inhibición de la salida de *Serratia* (Figura VI.1).

Con el fin de analizar si el agregado de $NiCl_2$ afecta la actividad de un canal de Ca^{2+} eucariota, se utilizó el fluoróforo de Ca^{2+} Fluo-4 AM. Este compuesto es una versión más sensible del Fluo-3 AM utilizado en el capítulo II. Para ello, se incubaron células CHO no invadidas en presencia o ausencia de 1 mM $NiCl_2$ y luego de 30 min, se adicionó Fluo-4 AM. Se adquirieron imágenes por microscopía confocal *in vivo* 30 min después de la adición del fluoróforo y, en los casos indicados, la concentración de $NiCl_2$ se mantuvo durante la microscopía. La intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM se cuantificó utilizando el programa ImageJ.

Como se puede ver en la Figura VI.5A, no se detectaron diferencias en la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM en presencia o ausencia de $NiCl_2$. Este resultado sugiere que, en células no invadidas, no hay modificaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular ocasionados por la adición de $NiCl_2$ y permite inferir que no hay un canal de Ca^{2+} eucariota que esté siendo bloqueado por $NiCl_2$. Por lo tanto, el efecto observado previamente en la reducción del egreso de *Serratia* sería causado por una inhibición de ShIA.

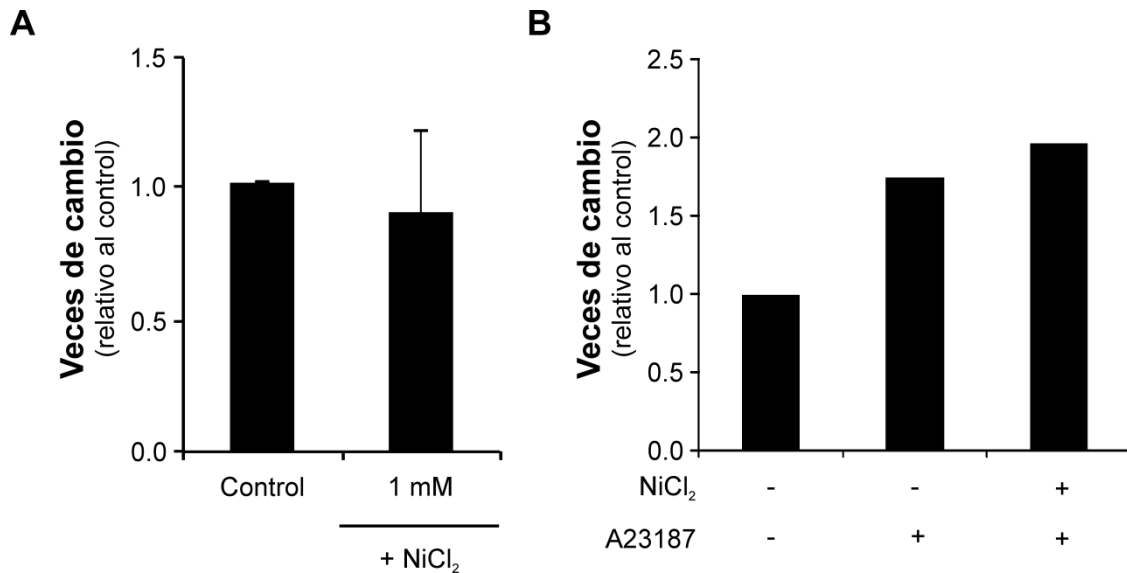


Figura VI.5. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo de Ca²⁺ Fluo-4 AM en células no invadidas. **A)** Se incubaron células CHO no invadidas en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ y 30 min después se agregó Fluo-4 AM. Se adquirieron las imágenes por microscopía confocal *in vivo* 30 min después de la adición del fluoróforo y, en el caso indicado, la concentración de NiCl₂ se mantuvo durante la microscopía. Se determinó la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM mediante el programa ImageJ. Se calcularon las veces de cambio en la intensidad de fluorescencia relativo al control. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos independientes. **B)** Se incubaron células CHO no invadidas en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ y 30 min después se agregó Fluo-4 AM. 20 min después se adicionó 20 µM A23187, en los casos indicados. Se adquirieron las imágenes por microscopía confocal *in vivo* 10 min después de la adición del ionóforo y, en el caso indicado, la concentración de NiCl₂ se mantuvo durante la microscopía. Se determinó la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM mediante el programa ImageJ. Se calcularon las veces de cambio en la intensidad de fluorescencia relativo al control sin tratar.

Para corroborar que las células CHO son responsivas a las variaciones en los niveles de Ca²⁺ intracelular y que dichas diferencias pueden ser detectadas por el método utilizado, se determinó la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM en células CHO no invadidas, en presencia de 20 µM ionóforo de Ca²⁺ A23187. Las células CHO no invadidas tratadas con el ionóforo presentaron un incremento en la intensidad de fluorescencia de Fluo-4 AM del 76% y 85% en ausencia y presencia de 1 mM NiCl₂, respectivamente, en comparación con las células no invadidas sin tratar (Figura VI.5B). Este resultado permite corroborar que las células CHO son responsivas a las variaciones en los niveles de Ca²⁺ intracelular y que el método utilizado para detectar cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺ es efectivo.

VI.2.2. Efecto del Ni²⁺ sobre la expresión y secreción de hemolisina ShIA

Los resultados mostrados en la sección previa sugieren que el Ni²⁺ no modula un canal de Ca²⁺ eucariota, sino que inhibe directamente a la hemolisina ShIA. En primer lugar, se corroboró que el agregado de Ni²⁺ no afecta el crecimiento de *S. marcescens*. Con dicho fin, se realizaron curvas de crecimiento en α -MEM o LB, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂.

Como se puede ver en la Figura VI.6, no hay diferencias significativas entre las curvas de crecimiento obtenidas en presencia o ausencia de Ni²⁺. En consecuencia, se puede concluir que el agregado de NiCl₂ no afecta el crecimiento de *Serratia* en LB ni en α -MEM.

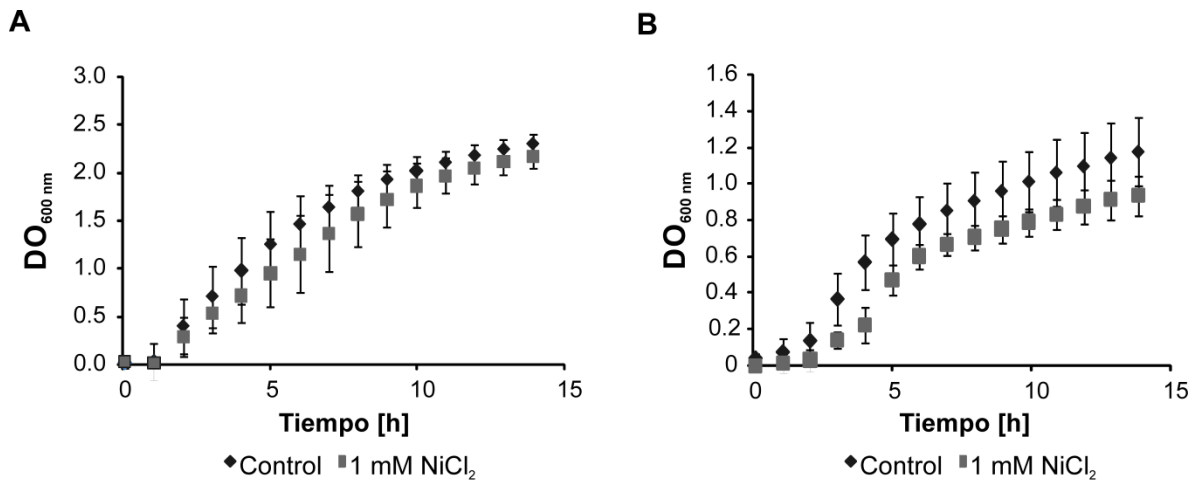


Figura VI.6. Curvas de crecimiento de *S. marcescens* en presencia de NiCl_2 . Se cultivó *S. marcescens* silvestre a 37°C en presencia o ausencia de 1 mM NiCl_2 durante 14 h en medio **A)** LB o **B)** α -MEM. Se realizaron medidas de absorbancia a 600 nm cada 1 h . Se muestra el promedio \pm S.D. para tres ensayos independientes.

Posteriormente, se examinó si el Ni^{2+} afecta la regulación de la expresión de ShIA. En primer lugar, se utilizó una herramienta generada previamente en el laboratorio, el vector reportero *ppromshIBA-gfp* (21). Este plásmido contiene una fusión transcripcional de la región promotora del operón *shIBA* al gen *gfp*, que codifica para la proteína verde fluorescente. Se crecieron cultivos de la cepa silvestre en presencia o ausencia de 1 mM NiCl_2 y se midió la intensidad de fluorescencia de GFP normalizada por la $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de actividad transcripcional del operón *shIBA* al comparar la presencia y ausencia de Ni^{2+} . Por lo tanto, se puede concluir que el agregado de 1 mM NiCl_2 no afecta la actividad transcripcional del operón *shIBA* (Figura VI.7A).

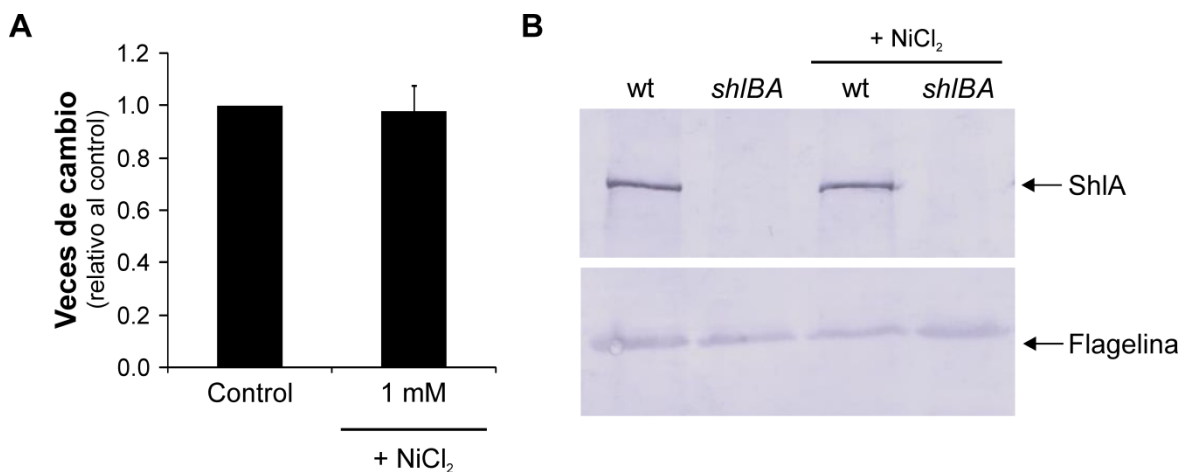


Figura VI.7. Actividad transcripcional y secreción de ShIA en presencia de NiCl_2 . **A)** Se crecieron los cultivos bacterianos de *S. marcescens/ppromshIBA-gfp* durante 16 h a 30°C , en presencia o ausencia de 1 mM NiCl_2 . Se midió la intensidad de fluorescencia de GFP (UF) y la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y se calculó la relación $\text{UF}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Se calcularon las veces de cambio en la inducción transcripcional relativo al control sin tratar. Se muestran los promedios \pm S.D. para tres ensayos independientes. **B)** Se cultivaron las bacterias durante 16 h a 30°C , en presencia o ausencia de 1 mM NiCl_2 . Los sobrenadantes de cultivos se filtraron, concentraron por precipitación con TCA y resuspendieron en solución de siembra desnaturizante. Se separaron las muestras mediante un SDS-PAGE y se realizó una transferencia y posterior inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti-ShIA (superior) o anti-flagelina (inferior, control de carga).

A continuación, se evaluó si el Ni^{2+} altera la secreción de ShIA. Con ese objetivo, se realizaron ensayos de inmunodetección de ShIA en sobrenadantes de cultivo. Se cultivaron las cepas indicadas en presencia o ausencia de 1 mM NiCl_2 . Los sobrenadantes de dichos cultivos se concentraron por precipitación con TCA y se separaron mediante un SDS-PAGE. Posteriormente, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-ShIA. Se utilizó flagelina como control de carga.

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de ShIA secretada en presencia o ausencia de NiCl_2 , ni se detectó un patrón de bandas proteicas diferencial. El resultado de este ensayo demuestra que el Ni^{2+} no induce la degradación de ShIA ni impide su secreción (Figura VI.7B).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta sección permiten concluir que el Ni^{2+} no tiene un efecto sobre el crecimiento de *Serratia*, ni sobre la regulación de la expresión o secreción de ShIA. Estos resultados contribuyen a mostrar que el Ni^{2+} bloquea específicamente la acción de ShIA.

VI.2.3. Efecto del Ni^{2+} sobre los fenotipos dependientes de ShIA

Con el fin de evaluar si otros fenotipos dependientes de ShIA son bloqueados por Ni^{2+} , se realizaron ensayos de co-localización con Fluo-4 AM en presencia de NiCl_2 en células invadidas. Como se demostró en el capítulo anterior, ShIA induce una movilización de Ca^{2+} intracelular localizada en la cercanía de la SeCV. Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO utilizando *S. marcescens* silvestre/*pcherry* o *S. marcescens shIBA/pcherry* con una MOI=10 y a 240 min p.i., se adicionó 1 mM NiCl_2 , si es indicado. Luego de una incubación de 30 min, se adicionó el fluoróforo Fluo-4 AM. Se capturaron las imágenes por microscopía confocal *in vivo* 30 min después.

La señal fluorescente de Fluo-4 AM se encontró yuxtapuesta a o co-localizando con el 51% de las wt-SeCV, mientras que sólo el 10% de las *shIBA*-SeCV se encontraron asociadas con señal de Fluo-4 AM (Figura VI.8A y B, paneles superior e inferior). El tratamiento con NiCl_2 redujo el porcentaje de co-localización de Fluo-4 AM con la wt-SeCV a un 22% (Figura VI.8A y B, panel central), mientras que no se presentaron cambios en los valores obtenidos al tratar a las células invadidas con la mutante *shIBA* (Figura VI.8A). Este resultado demuestra que la adición de Ni^{2+} impide la movilización de Ca^{2+} intracelular mediada por ShIA.

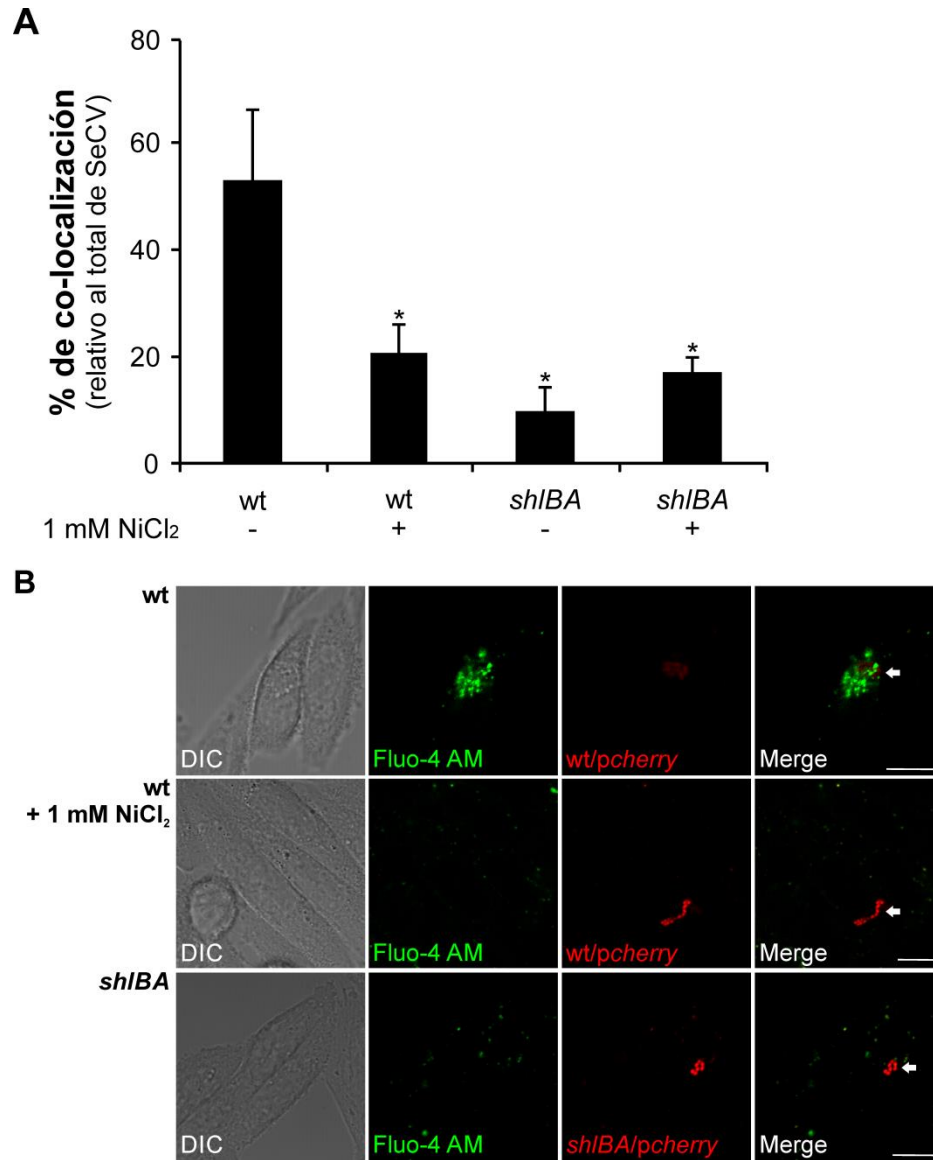


Figura VI.8. Co-localización de *Serratia* con el fluoróforo de Ca²⁺ Fluo-4 AM en presencia de NiCl₂. Se infectaron células CHO con la cepa silvestre/*pcherry* (*wt/pcherry*, fluorescencia roja) o mutante *shIBA/pcherry* (fluorescencia roja) con una MOI=10. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., se agregó 1 mM NiCl₂. El fluoróforo Fluo-4 AM (fluorescencia verde) se adicionó 30 min después. **A)** Se calculó el porcentaje de SeCV que co-localiza con Fluo-4 AM relativo al total de SeCV. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos (* p<0,05). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar. **B)** Se muestran imágenes representativas adquiridas por microscopía confocal. Las flechas señalan las SeCV. Barras: 10 μM.

Hertle y colaboradores reportaron que las células epiteliales son depletadas de ATP luego de ser incubadas con una baja concentración de ShIA purificada. A concentraciones mayores, ShIA causa una vacuolación irreversible y las células son lisadas. Estos efectos drásticos son atribuidos a la capacidad de ShIA de inducir depleción de ATP y eflujo de K⁺ desde las células epiteliales (147). Posteriormente, se demostró que el eflujo de K⁺ puede promover el disparo de una respuesta autofágica (233, 234). En el laboratorio se determinó que, luego del contacto con *Serratia*, se induce una respuesta autofágica en las células epiteliales previo a la internalización bacteriana y que dicho fenotipo es dependiente de ShIA (20, 21). Para corroborar si la respuesta autofágica inducida por *Serratia* es inhibida por Ni²⁺, células CHO expresando EGFP-LC3 se co-incubaron con *S. marcescens* silvestre o mutante

shIBA en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ o 40 μM BAPTA-AM. A 120 min p.i., las células se fijaron, se detectaron las bacterias por inmunofluorescencia indirecta y las muestras se inspeccionaron por microscopía confocal. Como se mencionó en el capítulo anterior, el BAPTA-AM es un quelante específico de Ca²⁺ intracelular y se adicionó al ensayo con el fin de examinar si la movilización de Ca²⁺ intracelular tiene un efecto sobre el proceso autofágico ocasionado por ShIA.

En primer lugar y con el fin de evaluar si el Ni²⁺ inhibe la respuesta autofágica causada por el hambre de aminoácidos, se indujo autofagia incubando las células en el medio EBSS en presencia o ausencia 1 mM NiCl₂. La inspección microscópica de las células eucariotas reveló que no hay diferencias significativas entre las células tratadas o sin tratar con NiCl₂ (Figura VI.9A). Este resultado indica que el Ni²⁺ no impide el proceso canónico de autofagia causado por el hambre de aminoácidos.

La respuesta autofágica se detecta por el patrón punteado de EGFP-LC3 en oposición con la distribución homogénea de la fluorescencia verde en las células control. Como se reportó previamente (21), la respuesta autofágica se indujo en un 59% de las células cuando se las incubó con la cepa silvestre (Figura VI.9A y B, panel superior). Cuando el ensayo se realizó incubando células CHO-EGFP-LC3 con la cepa mutante *shIBA*, no se detectó puntillado de LC3 (Figura VI.9A y B, panel inferior). Sólo el 25% de las células CHO-EGFP-LC3 co-incubadas con *Serratia* silvestre en presencia de NiCl₂ presentó el puntillado característico de un disparo de autofagia (Figura VI.9A y B, panel medio), mientras que el porcentaje de células autofágicas obtenidos con la mutante *shIBA* no se afectó por la adición de Ni²⁺ (Figura VI.9A). Como se puede ver en la Figura VI.9A, la adición de BAPTA-AM a las células incubadas con la cepa silvestre no afectó el porcentaje de células autofágicas. Estos resultados sugieren que el Ni²⁺ sólo inhibe la respuesta autofágica causada por ShIA y no la originada por el hambre de aminoácidos. Además, estos resultados permiten concluir que la respuesta autofágica inducida por *Serratia* es independiente de la movilización de Ca²⁺ intracelular.

Previamente, se reportó que un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular actúa como un potente inductor de la autofagia (235–237). Resultados previos obtenidos en el laboratorio demuestran que la respuesta autofágica inducida por ShIA es una vía no canónica, ya que no es impedida al utilizar wortmanina, un inhibidor de la PI3K III (20). El hecho de que la inducción de autofagia mediada por ShIA no se vea afectada por la adición de quelantes de Ca²⁺ apoya la idea de que es una vía no canónica. Teniendo en cuenta que se ha reportado que el transporte de iones K⁺ puede estar implicado en la autofagia (238, 239) y que ShIA ocasiona un eflujo de K⁺ (147), se puede postular la hipótesis de que la respuesta autofágica inducida por ShIA esté relacionada con una movilización de dicho ión.

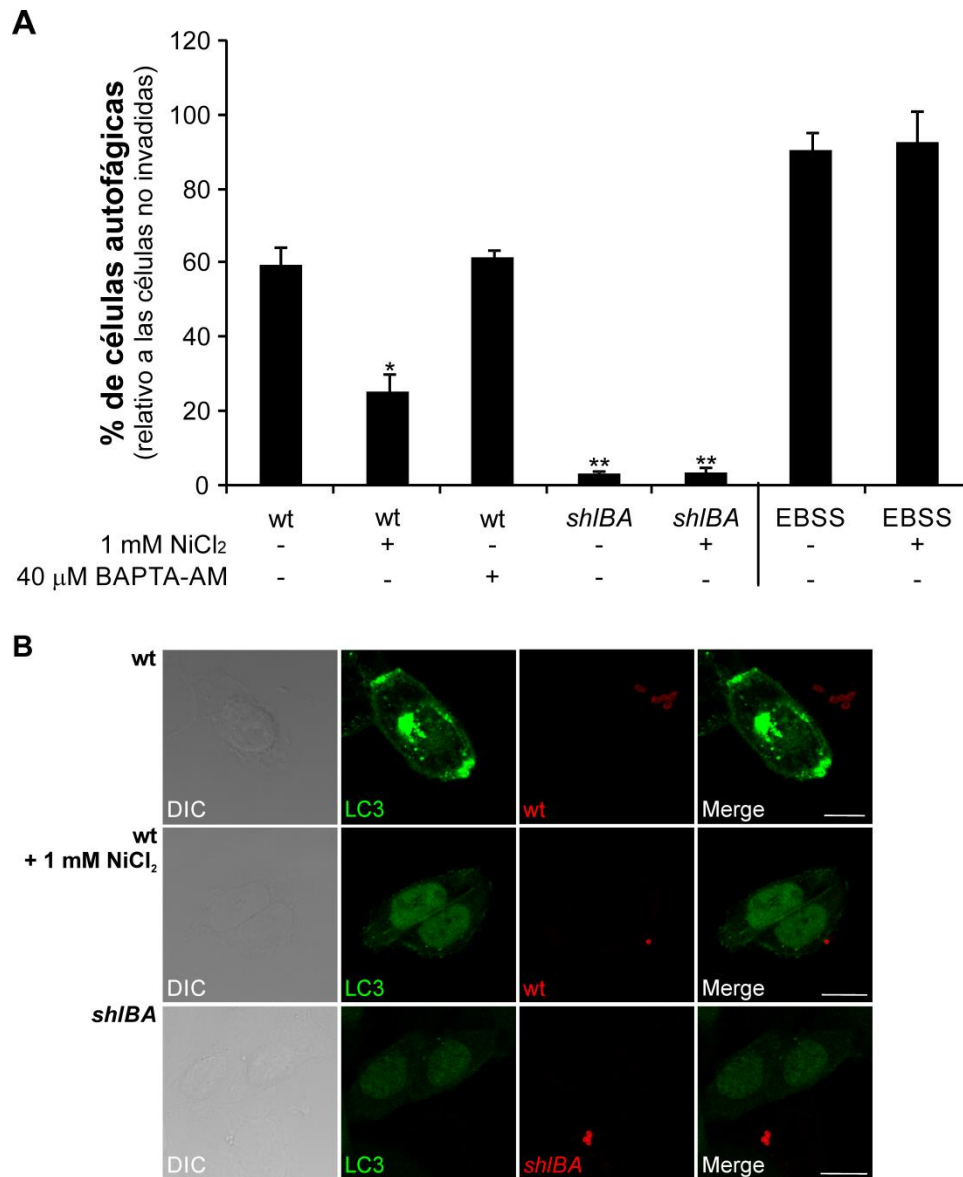


Figura VI.9. Ensayo de autofagia en presencia de NiCl₂. Se infectaron células CHO que expresan EGFP-LC3 (fluorescencia verde) con la cepa silvestre (wt, fluorescencia roja) o mutante *shIBA* (fluorescencia roja) con una MOI=10, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ o 40 μM BAPTA-AM. A 120 min p.i., se fijaron las células y se detectaron las bacterias por inmunofluorescencia indirecta. Células no invadidas se incubaron en medio EBSS en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ como control de la autofagia inducida por el hambre de aminoácidos. Se capturaron las imágenes por microscopía confocal. **A)** Se calculó el porcentaje de células con autofagia inducida relativo al total de células no invadidas. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos (* p<0,05 y ** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar. **B)** Se muestran imágenes representativas. Barras: 10 μM.

Los ensayos mostrados hasta el momento fueron realizados en condiciones no líticas: baja concentración de la PFT (baja MOI) o tiempos cortos de incubación de la bacteria con las células eucariotas. Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten concluir que el Ni²⁺ bloquea los fenotipos dependientes de ShIA en condiciones no líticas. Como se mencionó previamente, ShIA también es responsable de fenotipos líticos, como la citotoxicidad contra células en cultivo y la actividad hemolítica (23, 147). Para examinar si la citotoxicidad mediada por ShIA es inhibida por Ni²⁺, se realizaron ensayos de reducción de MTT, que permite medir viabilidad celular. Como se mencionó en el capítulo anterior, el MTT es reducido a formazán y la generación de este último compuesto se considera proporcional al número de células viables.

Células CHO fueron incubadas con *S. marcescens* silvestre o mutante *shIBA*, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ o 40 μM BAPTA-AM. A 180 min p.i., se agregó MTT. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo.

Cuando se incubaron células CHO con *S. marcescens* silvestre se obtuvo un 72% de citotoxicidad, en contraste la mutante *shIBA* sólo causó un 13% de citotoxicidad (Figura VI.10). La adición de 1 mM NiCl₂ redujo la citotoxicidad causada por la cepa silvestre a un 20%, mientras que la droga no alteró el porcentaje de citotoxicidad causado por la cepa mutante (Figura VI.10). Para evaluar si la citotoxicidad es provocada por la movilización de Ca²⁺ dependiente de ShIA, se evaluó si existe un efecto por la adición del quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA-AM. Como se muestra en la Figura VI.10, el agregado de BAPTA-AM no afectó el porcentaje de citotoxicidad. Estos resultados indican que el Ni²⁺ inhibe la acción de ShIA y que el efecto citotóxico no está mediado por alteraciones en la concentración intracelular de Ca²⁺.

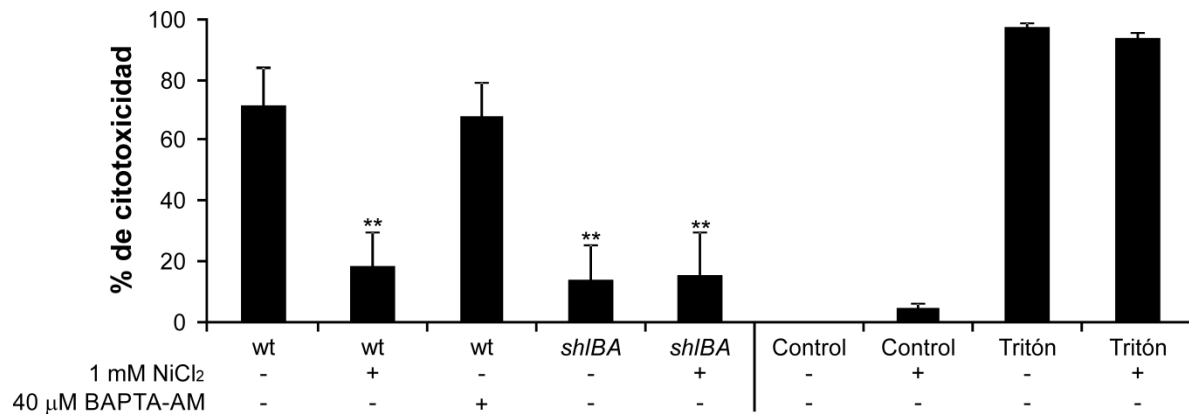


Figura VI.10. Ensayo de citotoxicidad en presencia de NiCl₂. Se incubaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shIBA* con una MOI=20, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ o de 40 μM BAPTA-AM. A 180 min p.i., se agregó MTT. Luego de la incubación, se disolvieron los cristales de formazán y se midió absorbancia a 570 nm y 630 nm. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Se indican los promedios ± S.D. para cuatro experimentos (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar.

Otro fenotipo lítico mediado por ShIA es la lisis de eritrocitos humanos. Para evaluar si este fenotipo está inhibido por Ni²⁺, se realizaron ensayos de actividad hemolítica en presencia de NiCl₂. La adición de NiCl₂ redujo 73% la actividad hemolítica de la cepa silvestre; en contraposición, no modificó la actividad hemolítica de la cepa mutante *shIBA* (Figura VI.11). El agregado de BAPTA-AM no alteró la capacidad hemolítica de *Serratia* (Figura VI.11). El tratamiento con NiCl₂ no afectó la estabilidad de los eritrocitos humanos ni la lisis osmótica causada por la incubación de los mismos en agua. Estos resultados permiten corroborar que el Ni²⁺ inhibe los fenotipos dependientes de ShIA y que la actividad hemolítica no es dependiente de la concentración de Ca²⁺ intracelular.

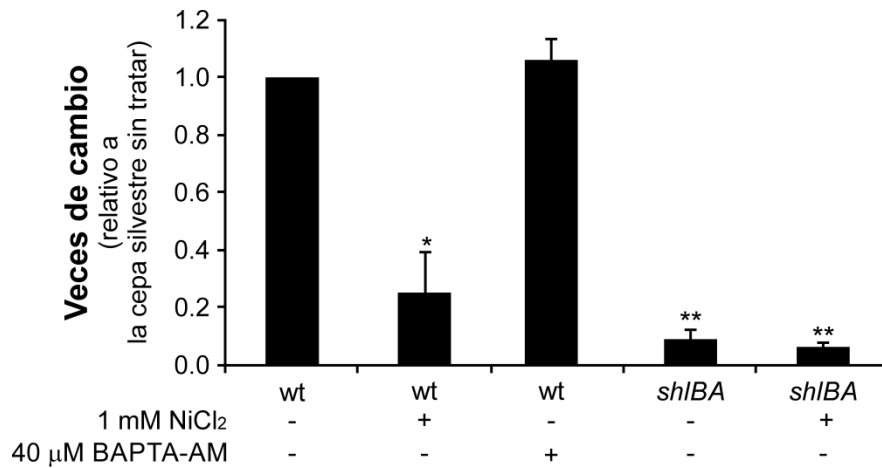


Figura VI.11. Ensayo de hemólisis en presencia de NiCl₂. Se incubaron cultivos de *S. marcescens* silvestre (wt) o mutante *shIBA* con eritrocitos humanos en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂ o de 40 μM BAPTA-AM. Se determinó la cantidad de hemoglobina liberada midiendo absorbancia a 562 nm. Se calcularon las veces de cambio en la actividad hemolítica relativo al valor obtenido para la cepa silvestre sin tratar. Se indican los promedios ± S.D. para cuatro experimentos (* p<0,05 y ** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten concluir que el Ni²⁺ inhibe todos los fenotipos dependientes de ShIA ensayados. Esta inhibición se origina sobre la acción de ShIA y no sobre la expresión o secreción de la proteína. Además, se puede postular que existen dos tipos de fenotipos dependientes de ShIA: los que son causados por *Serratia* intravacuolar (como el egreso o la co-localización con Fluo-4 AM) que son dependientes de la concentración Ca²⁺ intracelular; y aquellos fenotipos causados por la bacteria extracelular (autofagia, citotoxicidad y actividad hemolítica) que son independientes de las movilizaciones de Ca²⁺ intracelulares.

VI.2.4. Reversibilidad de la inhibición de ShIA causada por Ni²⁺

Previamente, se propuso que, en el caso de los canales de Ca²⁺ eucariotas, un mecanismo de inhibición ocasionado por Ni²⁺ sería la oclusión del poro del canal. Mlinar y Enyeart además reportaron que, en esos casos, la acción del Ni²⁺ es reversible (240). Para examinar la reversibilidad de acción del Ni²⁺, se incubaron células CHO con *S. marcescens* silvestre o mutante *shIBA*, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂. A 180 min p.i., se lavaron las células para eliminar las bacterias y se agregó medio suplementado con gentamicina y con 1 mM NiCl₂, si es indicado. A 240 min p.i., se evaluó la citotoxicidad por reducción de MTT. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo.

S. marcescens silvestre provocó un 83% de citotoxicidad, mientras que la cepa mutante *shIBA* sólo causó un 8% de citotoxicidad (Figura VI.12). La presencia de Ni²⁺ durante todo el ensayo redujo la citotoxicidad causada por la cepa silvestre a 35% (Figura VI.12). La eliminación del Ni²⁺, luego de un tratamiento de 3 h, provocó un 64% de citotoxicidad (Figura VI.12). Estos resultados demuestran que la inhibición de ShIA causada por Ni²⁺ puede ser revertida, apoyando la hipótesis de que el mecanismo de inhibición consistiría en la oclusión

del poro formado por ShIA.

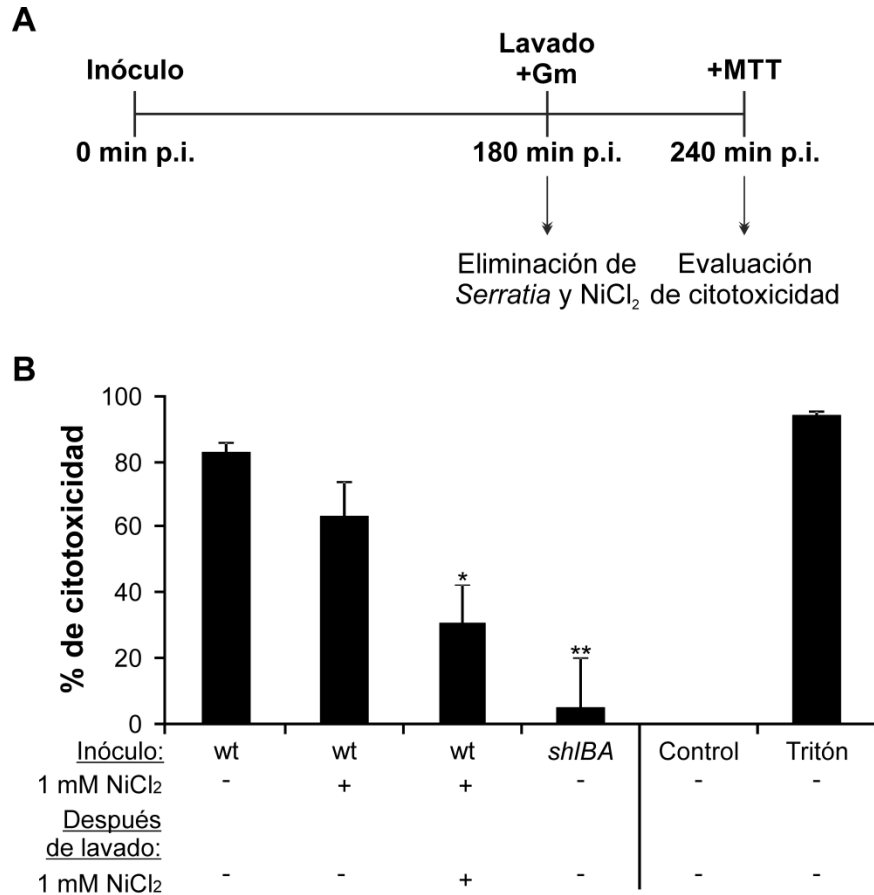


Figura VI.12. Ensayo de reversibilidad de la inhibición de ShIA. Se incubaron células CHO con la cepa silvestre (wt) o mutante *shlBA* con una MOI=20, en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂. A 180 min p.i., se lavaron las células con PBS para eliminar las bacterias extracelulares y se agregó medio suplementado con 50 µg/ml gentamicina (Gm) y con 1 mM NiCl₂, si es indicado. A 240 min p.i., se adicionó MTT. Se utilizaron células no invadidas tratadas con 0,1% Tritón X-100 como control positivo y células sin invadir y sin tratar como control negativo. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos (*p<0,05 y **p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar.

Por último, y con el fin de contribuir al estudio de la reversibilidad de la acción inhibitoria de Ni²⁺, se examinó el efecto del agregado de 1 mM NiCl₂ a tiempos cortos p.i. Para ello, se realizaron ensayos de protección a gentamicina en células CHO con una MOI=10 y 1 mM NiCl₂ al momento del inóculo. A 60 min p.i., se lavaron las células, se eliminó el NiCl₂ (en los casos indicados) y se agregó gentamicina. A 240 min p.i. se agregó medio de cultivo libre de antibiótico y a 360 min p.i. se determinaron las UFC extracelulares. A distintos tiempos p.i. se determinaron las UFC intracelulares. La concentración de NiCl₂ se mantuvo durante los 60 min iniciales del ensayo, durante 240 min o durante 360 min (el ensayo completo), según se indica en cada caso.

La adición de 1 mM NiCl₂ durante los primeros 60 min de la invasión no afectó la progresión de la SeCV (Figura VI.13A), ni alteró el egreso de *Serratia* (Figura VI.13B). Esto permite plantear dos hipótesis: que la inhibición de ShIA a tiempos tempranos en la invasión se revierte rápidamente en ausencia de Ni²⁺ o que ShIA es expresada a tiempos tardíos p.i. permitiendo así la salida bacteriana. Para examinar estas posibilidades, se extendió el tratamiento con NiCl₂. Como se muestra en la Figura VI.13B, la acción de Ni²⁺ por un periodo

extendido de 240 min provocó una disminución en la cantidad de UFC extracelulares. Por lo tanto, se puede confirmar que la acción de ShIA es bloqueada por Ni²⁺ en el período de tiempo entre 240 y 360 min p.i.

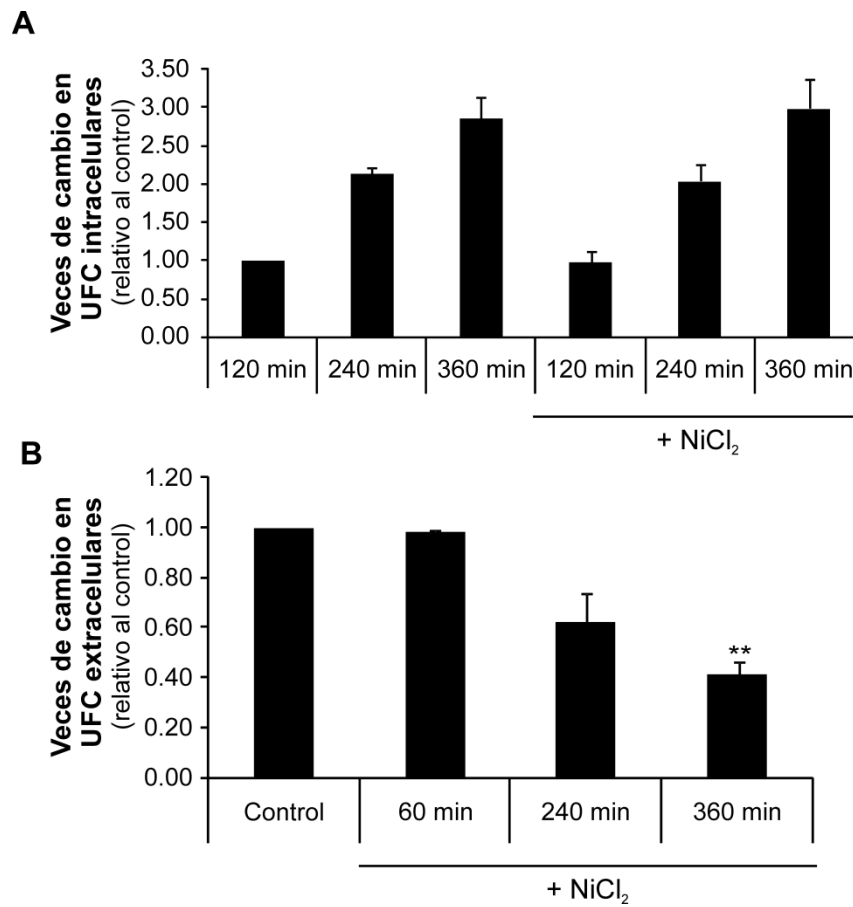


Figura VI.13. Ensayo de invasión y egreso en presencia de NiCl₂. **A)** Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una MOI=10 en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y se eliminó el NiCl₂. A los tiempos indicados p.i., se determinaron las UFC intracelulares. Se calcularon las veces de cambio relativo a las UFC recuperadas a 120 min p.i. en la condición control. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos independientes. **B)** Se infectaron células CHO con la cepa silvestre con una MOI=10 en presencia o ausencia de 1 mM NiCl₂. Luego de una incubación de 60 min, se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares y a 240 min p.i., el medio se reemplazó por medio libre de antibiótico. A 360 min p.i., se determinaron las UFC extracelulares. 1 mM NiCl₂ se mantuvo hasta los tiempos p.i. indicados. Se calcularon las veces de cambio relativo a las UFC recuperadas en la condición sin tratar. Se indican los promedios ± S.D. para tres experimentos independientes (** p<0,01). Se calcularon las diferencias estadísticas respecto al valor de la cepa silvestre sin tratar.

VI.3. DISCUSIÓN

En el capítulo anterior, se demostró que ShIA induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular localizado cerca de la SeCV y que esta movilización de Ca^{2+} es necesaria para llevar a cabo un mecanismo de egreso de tipo exocítico. Los resultados mostrados en dicho capítulo permitieron formular dos hipótesis acerca del mecanismo de acción de ShIA: a) que la hemolisina se inserta en la membrana eucariota permitiendo el pasaje de iones a través su poro o b) que modula la actividad de un canal de Ca^{2+} eucariota.

Este capítulo tuvo como objetivo abordar dichas hipótesis y caracterizar el mecanismo de acción de la hemolisina. Teniendo en cuenta que ShIA es responsable del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y que existen canales de Ca^{2+} eucariotas que son inhibidos por Ni^{2+} (222–225), se examinó si el egreso de *Serratia* se encuentra alterado en presencia de NiCl_2 . Los resultados obtenidos indican que la adición de Ni^{2+} impide el egreso de *Serratia* y sugieren que: a) el Ni^{2+} bloquea ShIA como el poro por el que pasan los iones o b) el Ni^{2+} bloquea un canal de Ca^{2+} eucariota que es modulado por ShIA.

Para discernir entre esas posibilidades se utilizaron distintos moduladores de canales de Ca^{2+} eucariotas. El mibefradil (inhibidor de los canales LVA y HVA), el 2-APB (inhibidor de reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP_3 y de SOCs) y la tapsgargina (inhibidor de la bomba SERCA) no tuvieron efecto sobre el egreso de *Serratia*, por lo que se puede inferir que dichos canales eucariotas no estarían involucrados en el mecanismo de salida del patógeno. Sin embargo, no se tuvo posibilidad de acceder a ensayos control adecuados para corroborar la acción directa de estos inhibidores sobre los canales eucariotas mencionados.

Posteriormente, y con el fin de analizar si el Ni^{2+} afecta un canal de Ca^{2+} eucariota, se evaluó si hay modificaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular en células no invadidas en presencia o ausencia de NiCl_2 , utilizando el fluoróforo Fluo-4 AM. Los resultados obtenidos indican que no hay modificaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular por la adición de NiCl_2 y sugieren que no hay un canal de Ca^{2+} eucariota que esté siendo bloqueado por NiCl_2 y que el efecto observado en el egreso es causado por una inhibición específicamente de ShIA.

Luego de corroborar que el NiCl_2 no afecta el crecimiento de *S. marcescens*, la expresión de la hemolisina o la secreción de la misma, se ensayó si otros fenotipos dependientes de ShIA son bloqueados por Ni^{2+} . Se demostró que la adición de Ni^{2+} bloquea todos los fenotipos dependientes de ShIA ensayados, ya sean en condiciones no líticas (egreso, movilización de Ca^{2+} intracelular y respuesta autofágica) o líticas (actividad hemolítica y citotoxicidad). En conjunto, los resultados presentados permiten concluir que el Ni^{2+} bloquea fenotipos mediados por ShIA. En presencia de 1 mM NiCl_2 , *S. marcescens* silvestre se comporta de un modo similar a la cepa mutante *shIBA*.

Además, se pueden distinguir dos efectos dependientes de ShIA. Los fenotipos causados por *Serratia* intravacuolar, en los cuales ShIA induce un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, pueden ser inhibidos utilizando un quelante de Ca^{2+} (Figura VI.14, panel

izquierdo). En contraste, cuando *S. marcescens* se encuentra en el medio extracelular expresa ShIA causando efectos en las células blanco que no pueden ser bloqueados por el secuestro del Ca^{2+} y, por lo tanto, no pueden ser atribuidos exclusivamente a una movilización de Ca^{2+} . De acuerdo con la literatura, estos últimos fenotipos, como la inducción de autofagia y la actividad hemolítica y citotóxica, podrían ser causados por la movilización de otros iones, como K^+ (147) (Figura VI.14, panel derecho). Dado que todos los fenotipos dependientes de ShIA ensayados en este capítulo son inhibidos por Ni^{2+} , se puede inferir que el metal actuaría ocluyendo el poro formado por ShIA en la membrana eucariota impidiendo el pasaje de Ca^{2+} y otros iones, como K^+ .

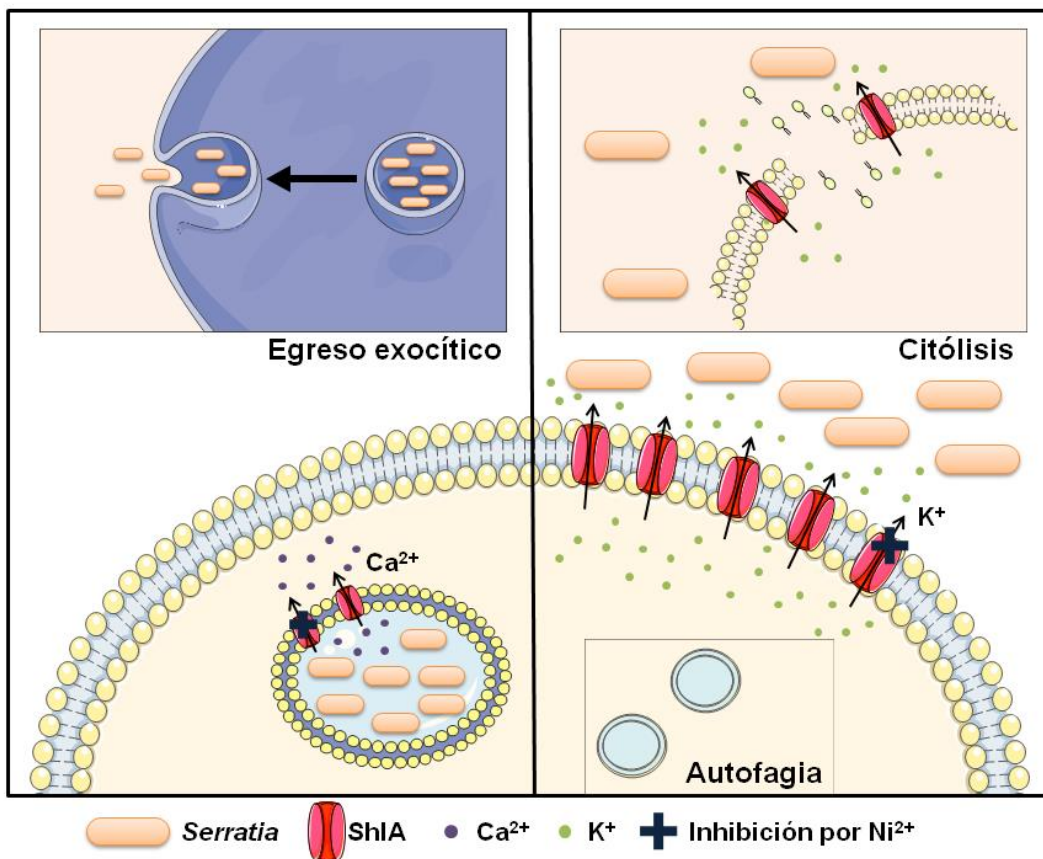


Figura VI.14. Representación esquemática del modelo propuesto.

Por último, se propuso que un mecanismo de inhibición del Ni^{2+} es la oclusión de los poros formados por los canales y que esta inhibición es reversible (240). Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de ShIA es reversible y apoyan la hipótesis de que el mecanismo de inhibición en este caso es la oclusión del poro formado por la hemolisina.

Se puede proponer que el uso controlado de Ni^{2+} en concentraciones determinadas para bloquear selectivamente ShIA sobre los canales de Ca^{2+} eucariotas podrá ser empleado como una nueva herramienta experimental que ayudará a diseccionar el mecanismo de acción de esta PFT.

VI.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el tercer capítulo de esta Tesis permiten formular las siguientes conclusiones:

- El agregado de NiCl_2 no afecta el crecimiento de *Serratia* ni la expresión y secreción de ShIA.
- La adición de Ni^{2+} bloquea tanto los fenotipos dependientes de ShIA en condiciones no líticas (egreso, movilización de Ca^{2+} intracelular y respuesta autofágica) como líticas (citotoxicidad en células en cultivo y actividad hemolítica).
- Existen dos tipos de fenotipos dependientes de ShIA: los que son causados por *Serratia* intracelular (como el egreso o la co-localización con Fluo-4 AM) y son dependientes de Ca^{2+} ; y los fenotipos que están causados por la bacteria extracelular (autofagia, citotoxicidad y hemólisis) que son independientes de las movilizaciones de Ca^{2+} intracelulares.
- La inhibición de ShIA causada por el Ni^{2+} es reversible, apoyando la hipótesis de que el mecanismo de inhibición es la oclusión del poro formado por ShIA.
- Los resultados obtenidos sugieren que los canales de Ca^{2+} HVA y los LVA, los reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP_3 , los SOCs y la bomba SERCA no estarían involucrados en el egreso de *S. marcescens*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grimont, F., y Grimont, P. A. D. (2006) The Genus *Serratia*. En *Prokaryotes*, pp 219-244.
2. Mahlen, S. D. (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (81).
3. Hejazi, A., y Falkiner, F. R. (1997) *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol.* 46 (11): 903-912.
4. Merlino, C. P. (1924) Bartolomeo Bizio's letter to the most eminent priest, Angelo Bellani, concerning the phenomenon of the red-colored polenta. 527-543.
5. Sehdev, P. S., y Donnenberg, M. S. (1999) Answer to Arcanum. *Clin. Infect. Dis.* 29: 925.
6. Petersen, L. M., y Tisa, L. S. (2013) Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can. J. Microbiol.*
7. Lawe-Davies, O. (2017) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *WHO Media Cent.*
8. Gastmeier, P. (2014) *Serratia marcescens* : an outbreak experience. 5 (March): 4-5.
9. Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., Hamamoto, H., Watanabe, T., y Sekimizu, K. (2012) *Serratia marcescens* induces apoptotic cell death in host immune cells via a lipopolysaccharide- and flagella-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*
10. Adamson, V., Mitt, P., Pisarev, H., Metsvaht, T., Telling, K., Naaber, P., y Maimets, M. (2012) Prolonged outbreak of *Serratia marcescens* in Tartu University Hospital: a case-control study. *BMC Infect. Dis.* 12: 281.
11. Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., y Sekimizu, K. (2014) *Serratia marcescens* Suppresses Host Cellular Immunity via the Production of an Adhesion-Inhibitory Factor Against Immunosurveillance Cells. *J. Biol. Chem.*
12. Su, L.-H., Ou, J. T., Leu, H.-S., Chiang, P.-C., Chiu, Y.-P., Chia, J.-H., Kuo, A.-J., Chiu, C.-H., Chu, C., Wu, T.-L., Sun, C.-F., Riley, T. V, y Chang, B. J. (2003) Extended Epidemic of Nosocomial Urinary Tract Infections Caused by *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4726-4732.
13. Posluszny Jr, J. A., Conrad, P., Halerz, M., Shankar, R., y Gamelli, R. L. (2012) Surgical Burn Wound Infections and Their Clinical Implications. *J. Burn Care Res.* 32 (2): 324-333.
14. Yu, V. (1979) *Serratia marcescens*: Historical perspective and Clinical review. *N. Engl. J. Med.* 372 (25): 2380-2382.
15. Hertle, R., y Schwarz, H. (2004) *Serratia marcescens* internalization and replication in human bladder epithelial cells. *BMC Infect. Dis.* 4: 16-30.
16. Krzymińska, S., Ochocka, K., y Kaznowski, A. (2012) Apoptosis of Epithelial Cells and Macrophages due to Nonpigmented *Serratia marcescens* Strains. *Sci. World Journal*: 67939.
17. Krzymińska, S., Raczkowska, M., y Kaznowski, A. (2010) Cytotoxic activity of *Serratia marcescens* clinical isolates. *Polish J. Microbiol.* 59 (3): 201-205.
18. Kurz, L., Chauvet, S., Andrés, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., de Bentzmann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J. A., Finlay, B. B., Gorvel, J.-P., Ferrandon, D., y Ewbank, J. J. (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J.* 22 (7): 1451-1460.

19. Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. a, Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J. F., Fujioka, H., Poulain, D., Sendid, B., y Ghannoum, M. a. (2016) Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *MBio* 7 (5): e01250-16.
20. Fedrigo, G. V, Campoy, E. M., Di Venanzio, G., Colombo, M. I., y García Vescovi, E. (2011) *Serratia marcescens* is able to survive and proliferate in autophagic-like vacuoles inside non-phagocytic cells. *PLoS One* 6 (8): 1-15.
21. Di Venanzio, G., Stepanenko, T. M., y García Vescovi, E. (2014) *Serratia marcescens* ShIA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. *Infect. Immun.* 82 (9): 3542-3554.
22. Barchiesi, J., Castelli, M. E., Di Venanzio, G., Colombo, M. I., y Vescovi, E. G. (2012) The Phop/PhoQ system and its role in *Serratia marcescens* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 194 (11): 2949-2961.
23. Hertle, R. (2000) *Serratia* type pore forming toxins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1: 75-89.
24. Williams, R. P. (1973) Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* 25 (3): 396-402.
25. Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. a a, Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J., y Salmond, G. P. C. (2005) Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyI-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* 56 (4): 971-989.
26. Sleight, D. (1983) Antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Br. Med. J.* 287 (6411): 1651-1652.
27. Joris, B., De Meester, F., Galleni, M., Masson, S., Dusart, J., Frère, J.-M., Van Beeumen, J., Bush, K., y Sykes, R. (1986) Properties of a class C beta-lactamase from *Serratia marcescens*. *Biochem. J.* 239: 581-586.
28. Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Gruger, T., y Wiedemann, B. (2003) Natural antimicrobial susceptibilities of strains of «unusual» *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 865-885.
29. Kumar, A., y Worobec, E. A. (2002) Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 593-596.
30. Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. I, y Salmond, G. P. C. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
31. Van Houdt, R., Givskov, M., y Michiels, C. W. (2007) Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 407-424.
32. Eberl, L., Molin, S., y Givskov, M. (1999) Surface Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 181 (6): 1703-1712.
33. Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., y Bassler, B. L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* 41 (2): 463-476.
34. Coulthurst, S. J., Williamson, N. R., Harris, A. K. P., Spring, D. R., y Salmond, G. P. C. (2006) Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens* : mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum- sensing capacities. *Microbiology* 152: 1899-1911.

35. Macnab, R. M. (2003) How Bacteria Assemble Flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (1): 77-100.
36. Anderson, J. K., Smith, T. G., y Hoover, T. R. (2010) Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol.* 18 (1): 30-37.
37. Patrick, J. E., y Kearns, D. B. (2012) Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 83 (1): 14-23.
38. Castelli, M. E., y García Véscovi, E. (2011) The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 193 (1): 63-74.
39. Eberl, L., Christiansen, G., Molin, S., y Givskov, M. (1996) Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J. Bacteriol.* 178 (2): 554-559.
40. Alberti, L., y Harshey, R. M. (1990) Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 172 (8): 4322-4328.
41. Paruchuri, D. K., y Harshey, R. M. (1987) Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with color variation. *J. Bacteriol.* 169 (1): 61-5.
42. Lai, H., Soo, P., Wei, J., Yi, W., Liaw, S., Horng, Y., Lin, S., Ho, S., Swift, S., y Williams, P. (2005) The RssAB Two-Component Signal Transduction System in *Serratia marcescens* Regulates Swarming Motility and Cell Envelope Architecture in Response to Exogenous Saturated Fatty Acids. *J. Bacteriol.* 187 (10): 3407-3414.
43. Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H., y Yano, I. (1992) A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 174 (6): 1769-1776.
44. Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S., y Yano, I. (1986) Extracellular Vesicle Formation and Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 865-875.
45. Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., y Molin, S. (1998) N -Acyl- L - Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 180 (23): 6384-6388.
46. Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaeer, J., Vermant, J., y Michiels, J. (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16 (10): 496-506.
47. Labbate, M., Zhu, H., Thung, L., Bandara, R., Larsen, M. R., Willcox, M. D. P., Givskov, M., Rice, S. a, y Kjelleberg, S. (2007) Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J. Bacteriol.* 189 (7): 2702-2711.
48. Tsai, Y.-H., Wei, J.-R., Lin, C.-S., Chen, P.-H., Huang, S., Lin, Y.-C., Wei, C.-F., Lu, C.-C., y Lai, H.-C. (2011) RssAB signaling coordinates early development of surface multicellularity in *Serratia marcescens*. *PLoS One* 6 (8): e24154.
49. Rice, S. A., Koh, K. S., Queck, S. Y., Labbate, M., Lam, K. W., Kjelleberg, S., y Al, R. E. T. (2005) Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *J. Bacteriol.* 187 (10): 3477-3485.
50. Riedel, K., Ohnesorg, T., Krogfelt, K. A., Hansen, T. S., Omori, K., Givskov, M., y Eberl, L. E. O. (2001) N -Acyl- L -Homoserine Lactone-Mediated Regulation of the Lip Secretion System in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 183 (5): 1805-1809.

51. Shanks, R. M. Q., Stella, N. A., Hunt, K. M., Brothers, K. M., Zhang, L., y Thibodeau, P. H. (2015) Identification of SlpB, a cytotoxic protease from *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 83 (7): 2907-2916.
52. Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., y Tosa, T. (1994) The lipA Gene of *Serratia marcescens* Which Encodes an Extracellular Lipase Having No N-Terminal Signal Peptide. *J. Bacteriol.* 176 (7): 1949-1956.
53. Kawai, E., Akatsuka, H., Idei, A., Shibatani, T., y Omori, K. (1998) *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* 27 (5): 941-952.
54. Marty, K. B., Williams, C. L., Guynn, L. J., Benedik, M. J., y Blanke, S. R. (2002) Characterization of a Cytotoxic Factor in Culture Filtrates of *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 70 (3): 1121-1128.
55. Kida, Y., Inoue, H., Shimizu, T., y Kuwano, K. (2007) *Serratia marcescens* Serralyisin Induces Inflammatory Responses through Protease-Activated Receptor 2. *Infect. Immun.* 75 (1): 164-174.
56. Bruna, R. E., Molino, M. V., Lazzaro, M., Mariscotti, J. F., y Vescovi, E. G. (2018) CpxR-dependent thermoregulation of *Serratia marcescens* PrtA metalloprotease expression and its contribution to bacterial biofilm formation. *J. Bacteriol.*
57. Givskov, M., Olsen, L., y Molin, S. (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.* 170 (12): 5855-5862.
58. Castelli, M. E., Fedrigo, G. V., Clementín, A. L., Ielmini, M. V., Feldman, M. F., y García Vescovi, E. (2008) Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190 (1): 213-220.
59. Shimuta, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., y Watanabe, H. (2009) The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiol.* 9: 261.
60. Eaves, G. N., Jeffries, C. D., y Wayne, G. N. (1962) Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens*. 273-278.
61. Benedik, M. J., y Strych, U. (1998) *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiol. Lett.* 165: 1-13.
62. Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., y Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (6): 343-359.
63. Journet, L., y Cascales, E. (2016) The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSalPlus*: 1-30.
64. Bingle, L. E., Bailey, C. M., y Pallen, M. J. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11 (1): 3-8.
65. Basler, M. (2015) Type VI secretion system: Secretion by a contractile nanomachine. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370 (1679).
66. Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M. S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., Cambillau, C., y Cascales, E. (2011) Towards a structural comprehension of bacterial type vi secretion systems: Characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar. *PLoS Pathog.* 7 (11): 1-11.
67. Durand, E., Nguyen, V. S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M. S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujancourt, A., Roussel, A., Cambillau, C., Cascales, E., y

- Fronzes, R. (2015) Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature* 523 (7562): 555-560.
68. Cascales, E., y Cambillau, C. (2012) Structural biology of type VI secretion systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367 (1592): 1102-11.
69. Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y. R., Douzi, B., Cambillau, C., Cascales, E., y Journet, L. (2013) TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *J. Biol. Chem.* 288 (38): 27031-27041.
70. Alteri, C. J., y Mobley, H. L. T. (2016) The versatile type VI secretion system. *Microb. Spectr* 4 (2).
71. Brackmann, M., Wang, J., y Basler, M. (2017) Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction. *EMBO Rep.* 19 (2): e201744416.
72. Wang, T., Si, M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wei, G., Luo, Z. Q., y Shen, X. (2015) Type VI Secretion System Transports Zn²⁺ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. *PLoS Pathog.* 11 (7): 1-25.
73. Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., y Mekalanos, J. J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (39): 15508-15513.
74. Toesca, I. J., French, C. T., y Miller, J. F. (2014) The type VI secretion system spike protein VgrG5 mediates membrane fusion during intercellular spread by pseudomallei group Burkholderia species. *Infect. Immun.* 82 (4): 1436-1444.
75. Dong, T. G., Ho, B. T., Yoder-Himes, D. R., y Mekalanos, J. J. (2013) Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (7): 2623-2628.
76. Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., De Leon, J. a., Cunningham, D. a., Tran, B. Q., Low, D. a., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., y Mougous, J. D. (2014) Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol. Microbiol.* 92 (3): 529-542.
77. Unterweger, D., Kostiuk, B., Otjengerdes, R., Wilton, a., Diaz-Satizabal, L., y Pukatzki, S. (2015) Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* 34 (16): 2198-2210.
78. Liang, X., Moore, R., Wilton, M., Wong, M. J. Q., Lam, L., y Dong, T. G. (2015) Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (29): 9106-9111.
79. Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., Gonen, T., y Mougous, J. D. (2013) Haemolysin Coregulated Protein Is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates. *Mol. Cell* 51 (5): 584-593.
80. Lin, J. S., Ma, L. S., y Lai, E. M. (2013) Systematic Dissection of the *Agrobacterium* Type VI Secretion System Reveals Machinery and Secreted Components for Subcomplex Formation. *PLoS One* 8 (7).
81. De Pace, F., Nakazato, G., Pacheco, A., De Paiva, J. B., Sperandio, V., y Da Silveira, W. D. (2010) The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 78 (12): 4990-4998.

82. Wang, S., Dai, J., Meng, Q., Han, X., Han, Y., Zhao, Y., Yang, D., Ding, C., y Yu, S. (2014) DotU expression is highly induced during in vivo infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 5 (NOV): 1-13.
83. Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., y Mekalanos, J. J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell Host Microbe* 5 (3): 234-243.
84. Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., y Jin, Q. (2014) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe* 15 (5): 600-610.
85. Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K. L., Filloux, A., Superti-Furga, G., Voulhoux, R., y Bleves, S. (2015) Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network. *MBio* 6 (3): 570-576.
86. De Pace, F., de Paiva, J. B., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sirsili, M. P., Stehling, E. G., da Silveira, W. D., y Sperandio, V. (2011) Characterization of *icmF* of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology* 157 (10): 2954-2962.
87. Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E., y Journet, L. (2014) VgrG, Tae, Tle, and beyond: The versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol.* 22 (9): 498-507.
88. Jamet, A., y Nassif, X. (2015) New players in the toxin field: Polymorphic toxin systems in bacteria. *MBio* 6 (3): 1-8.
89. Benz, J., y Meinhart, A. (2014) Antibacterial effector/immunity systems: It's just the tip of the iceberg. *Curr. Opin. Microbiol.* 17 (1): 1-10.
90. Zheng, J., Shin, O. S., Cameron, D. E., y Mekalanos, J. J. (2010) Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (49): 21128-21133.
91. Aubert, D. F., Flannagan, R. S., y Valvano, M. a. (2008) A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun.* 76 (5): 1979-1991.
92. Brunet, Y. R., Bernard, C. S., Gavioli, M., Llobès, R., y Cascales, E. (2011) An epigenetic switch involving overlapping *fur* and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster. *PLoS Genet.* 7 (7).
93. Salomon, D., Gonzalez, H., Updegraff, B. L., y Orth, K. (2013) *Vibrio parahaemolyticus* Type VI Secretion System 1 Is Activated in Marine Conditions to Target Bacteria, and Is Differentially Regulated from System 2. *PLoS One* 8 (4).
94. Gueguen, E., Durand, E., Zhang, X. Y., d'Amalric, Q., Journet, L., y Cascales, E. (2013) Expression of a *Yersinia pseudotuberculosis* Type VI Secretion System Is Responsive to Envelope Stresses through the OmpR Transcriptional Activator. *PLoS One* 8 (6).
95. Ishikawa, T., Rompikuntal, P. K., Lindmark, B., Milton, D. L., y Wai, S. N. (2009) Quorum sensing regulation of the two *hcp* alleles in *Vibrio cholerae* O1 strains. *PLoS One* 4 (8).
96. Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., y Rahme, L. G. (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155 (9): 2845-2855.
97. Basler, M., Ho, B. T., y Mekalanos, J. J. (2013) Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell* 152 (4): 884-894.

98. Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., y Ho, B., Basler, M., Mekalanos, J. (2013) Type VI secretion system-mediated Immunity to Type IV secretion system-mediated Horizontal Gene Transfer. *Science* (80-.). 342 (6155): 250-253.
99. Mougous, J. D., Gifford, C. a, Ramsdell, T. L., y Mekalanos, J. J. (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9 (7): 797-803.
100. Leroux, M., Kirkpatrick, R. L., Montauti, E. I., Tran, B. Q., Peterson, S. B., Harding, B. N., Whitney, J. C., Russell, A. B., Traxler, B., Goo, Y. A., Goodlett, D. R., Wiggins, P. A., y Mougous, J. D. (2015) Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. 1-25.
101. Murdoch, S. L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M. J., Pourkarimi, E., y Coulthurst, S. J. (2011) The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *J. Bacteriol.* 193 (21): 6057-6069.
102. English, G., Trunk, K., Rao, V. a, Srikannathasan, V., Hunter, W. N., y Coulthurst, S. J. (2012) New secreted toxins and immunity proteins encoded within the type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* 86 (4): 921-936.
103. Fritsch, M. J., Trunk, K., Diniz, J. A., Guo, M., Trost, M., y Coulthurst, S. J. (2013) Proteomic identification of novel secreted antibacterial toxins of the *Serratia marcescens* type VI secretion system. *Mol. Cell. Proteomics* 12 (10): 2735-49.
104. Alcoforado Diniz, J., y Coulthurst, S. J. (2015) Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *J. Bacteriol.* 197 (14): 2350-2360.
105. Trunk, K., Peltier, J., Liu, Y. C., Dill, B. D., Walker, L., Gow, N. a. R., Stark, M. J. R., Quinn, J., Strahl, H., Trost, M., y Coulthurst, S. J. (2018) The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nat. Microbiol.* 3 (8): 920-931.
106. Cianfanelli, F. R., Alcoforado Diniz, J., Guo, M., De Cesare, V., Trost, M., y Coulthurst, S. J. (2016) VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. *PLoS Pathog.* 12 (6): 1-27.
107. Srikannathasan, V., English, G., Bui, N. K., Trunk, K., O'Rourke, P. E. F., Rao, V. a., Vollmer, W., Coulthurst, S. J., y Hunter, W. N. (2013) Structural basis for type VI secreted peptidoglycan di-endopeptidase function, specificity and neutralization in *Serratia marcescens*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69 (12): 2468-2482.
108. Gerc, A. J., Diepold, A., Trunk, K., Armitage, J. P., Stanley-wall, N. R., Coulthurst, S. J., Stanley-wall, N. R., y Coulthurst, S. J. (2015) Visualization of the *Serratia* Type VI Secretion System Reveals Unprovoked Attacks and Dynamic Article Visualization of the *Serratia* Type VI Secretion System Reveals Unprovoked Attacks and Dynamic Assembly. *CellReports* 12 (12): 2131-2142.
109. Beier, D., y Gross, R. (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9 (2): 143-152.
110. Goulian, M. (2010) Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (2): 184-189.
111. Gao, R., Mack, T. R., y Stock, A. M. (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* 32 (5): 225-234.
112. Kenney, L. J. (2010) How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (2): 168-176.

113. Majdalani, N., y Gottesman, S. (2006) The Rcs Phosphorelay : A Complex Signal Transduction System. *Annu. Rev. Microbiol.*
114. Clarke, D. J. (2010) The Rcs phosphorelay: More than just a two-component pathway. *Future Microbiol.* 5 (8): 1173-1184.
115. Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., y Gottesman, S. (2005) Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 187 (19): 6770-6778.
116. Mariscotti, J. F., y Portillo, F. G. Del. (2009) Genome expression analyses revealing the modulation of the salmonella Rcs regulon by the attenuator IgaA. *J. Bacteriol.* 191 (6): 1855-1867.
117. Cho, S. H., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Roszczenko, P., Asmar, A., Laloux, G., Hov, A. K., Leverrier, P., Van Der Henst, C., Vertommen, D., Typas, A., y Collet, J. F. (2014) Detecting envelope stress by monitoring β -barrel assembly. *Cell* 159 (7): 1652-1664.
118. Ebel, W., Vaughn, G. J., Peters, H. K., y Trempy, J. E. (1997) Inactivation of mdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 179 (21): 6858-6861.
119. Kelley, W. L., y Georgopoulos, C. (1997) Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 25 (5): 913-931.
120. Parker, C. T., Kloser, a. W., Schnaitman, C. a., Stein, M. a., Gottesman, S., y Gibson, B. W. (1992) Role of the rfaG and rfaP genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 174 (8): 2525-2538.
121. Ferrières, L., y Clarke, D. J. (2003) The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in Escherichia coli K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol. Microbiol.* 50 (5): 1665-1682.
122. Kannan, G., Wilks, J. C., Fitzgerald, D. M., Jones, B. D., BonDurant, S. S., y Slonczewski, J. L. (2008) Rapid acid treatment of Escherichia coli: Transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiol.* 8: 1-13.
123. Sledjeski, D. D., y Gottesman, S. (1996) Osmotic shock induction of capsule synthesis in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 178 (4): 1204-1206.
124. Hagiwara, D., Sugiura, M., Oshima, T., Mori, H., Aiba, H., Yamashino, T., y Mizuno, T. (2003) Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 185 (19): 5735-5746.
125. Mouslim, C., Delgado, M., y Groisman, E. a. (2004) Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates Salmonella virulence. *Mol. Microbiol.* 54 (2): 386-395.
126. Belas, R., Schneider, R., y Melch, M. (1998) Characterization of Proteus mirabilis precocious swarming mutants: Identification of rsbA, encoding a regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol.* 180 (23): 6126-6139.
127. Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M., y Harshey, R. M. (2007) The RcsCDB signaling system and swarming motility in Salmonella enterica serovar typhimurium: Dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J. Bacteriol.* 189 (23): 8447-8457.
128. Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M. P., Gutierrez, C., y Cam, K. (2003) RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 49 (3): 823-832.

129. McMahon, K. J., Castelli, M. E., García Vescovi, E., y Feldman, M. F. (2012) Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J. Bacteriol.* 194 (12): 3241-3249.
130. Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., y Clantin, B. (2013) Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res. Microbiol.* 164: 583-595.
131. Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., y Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40 (2): 306-313.
132. Mazar, J., y Cotter, P. a. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol.* 15 (11): 508-515.
133. Poole, K., Schiebel, E., y Braun, V. (1988) Molecular Characterization of the Hemolysin Determinant of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170 (7): 3177-3188.
134. Hertle, R., Brutsche, S., Groeger, W., Hobbie, S., Koch, W., Könninger, U. W., y Braun, V. (1997) Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol. Microbiol.* 26 (5): 853-65.
135. Schiebel, E., Schwarz, H., y Braun, V. (1989) Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* 264 (27): 16311-16320.
136. Könninger, U. W., Hobbie, S., Benz, R., y Braun, V. (1999) The haemolysin-secreting ShIB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShIB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol. Microbiol.* 32 (6): 1212-1225.
137. Pramanik, A., Könninger, U., Selvam, A., y Braun, V. (2013) Secretion and activation of the *Serratia marcescens* hemolysin by structurally defined ShIB mutants. *Int. J. Med. Microbiol.*: 1-9.
138. Sánchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M., y Valencia, A. (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of b-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28 (10): 521-523.
139. Poole, K., y Braun, V. (1988) Influence of growth temperature and lipopolysaccharide on hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170 (11): 5146-5152.
140. Marre, R., Hacker, J., y Braun, V. (1989) The cell-bound hemolysin of *Serratia marcescens* contributes to uropathogenicity. *Microb. Pathog.* 7: 153-156.
141. Lin, C.-S., Horng, J.-T., Yang, C.-H., Tsai, Y.-H., Su, L.-H., Wei, C.-F., Chen, C.-C., Hsieh, S.-C., Lu, C.-C., y Lai, H.-C. (2010) RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 78 (11): 4870-4881.
142. Braun, V., Giinther, H., Neub, B., y Tautz, C. (1985) Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 141: 371-376.
143. Poole, K., y Braun, V. (1988) Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect. Immun.* 56 (11): 2967-2971.
144. Létoffé, S., Ghigo, J. M., y Wandersman, C. (1994) *Iron acquisition from heme and hemoglobin by a Serratia marcescens extracellular protein (ABC transporter/heme-binding protein)*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44920/pdf/pnas01143-0221.pdf>.
145. Di Venanzio, G., Lazzaro, M., Morales, E. S., Krapf, D., y García Vescovi, E. (2017) A pore-forming toxin enables *Serratia* a nonlytic egress from host cells. *Cell. Microbiol.* 19 (2): 1-12.

146. König, W., Faltin, Y., Scheffer, J., Schöffler, H., y Braun, V. (1987) Role of cell-bound hemolysin as a pathogenicity factor for *Serratia* infections. *Infect. Immun.* 55 (11): 2554-2561.
147. Hertle, R., Hilger, M., Weingardt-Kocher, S., y Walev, I. (1999) Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. *Infect. Immun.* 67 (2): 817-825.
148. Ristow, L. C., y Welch, R. a. (2016) Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (3): 538-545.
149. Bischofberger, M., Gonzalez, M. R., y van der Goot, F. G. (2009) Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (4): 589-595.
150. Etxaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C., y Ostolaza, H. (2018) Membrane repair mechanisms against permeabilization by pore-forming toxins. *Toxins (Basel).* 10 (6).
151. Gekara, N. O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., y Weiss, S. (2007) The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* 9 (8): 2008-2021.
152. Repp, H., Pamukçi, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., y Dreyer, F. (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell. Microbiol.* 4 (8): 483-491.
153. Wiles, T. J., y Mulvey, M. A. (2013) The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: Progress and perspectives. *Future Microbiol.* 8 (1): 73-84.
154. Flannagan, R. S., Cosío, G., y Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (5): 355-366.
155. Cossart, P., y Sansonetti, P. J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science (80-)*. 304 (5668): 242-248.
156. Alix, E., Mukherjee, S., y Roy, C. R. (2011) Subversion of membrane transport pathways by vacuolar pathogens. *J. Cell Biol.* 195 (6): 943-952.
157. Segev, N. (2011) Coordination of intracellular transport steps by GTPases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (1): 33-38.
158. Hughson, F. M., y Reinisch, K. M. (2010) Structure and mechanism in membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (4): 454-460.
159. Colombo, M. I. (2007) Autophagy: A Pathogen Driven Process. *IUBMB Life* 59 (4): 238-242.
160. Deretic, V., y Levine, B. (2009) Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5 (6): 527-549.
161. Siqueira, M. D. S., Ribeiro, R. D. M., y Travassos, L. H. (2018) Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol.* 9 (MAY).
162. Tanida, I., y Waguri, S. (2010) Measurement of Autophagy in Cells and Tissues. *Methods Mol Biol* 648: 193-214.
163. Friedrich, N., Hagedorn, M., Soldati-Favre, D., y Soldati, T. (2012) Prison Break: Pathogens' Strategies To Egress from Host Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (4): 707-720.
164. Martinez, E., Siadous, F. A., y Bonazzi, M. (2018) Tiny architects: biogenesis of intracellular replicative niches by bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* (May 2018).

165. Chen, J., De Felipe, K. S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Segal, G., y Shuman, H. a. (2004) Legionellil Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science* (80-.). 303 (5662): 1358-1361.
166. Takeuchi, H., Furuta, N., Morisaki, I., y Amano, A. (2011) Exit of intracellular Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cell. Microbiol.* 13 (5): 677-691.
167. Beatty, W. L. (2007) Lysosome repair enables host cell survival and bacterial persistence following Chlamydia trachomatis infection. *Cell. Microbiol.* 9 (9): 2141-2152.
168. Hybiske, K., y Stephens, R. S. (2007) Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
169. Page, A. L., Ohayon, H., Sansonetti, P. J., y Parsot, C. (1999) The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of Shigella flexneri. *Cell. Microbiol.* 1 (2): 183-193.
170. Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Baxter, M. A., Harrington, A. T., Blocker, A., y Picking, W. D. (2005) IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect. Immun.* 73 (3): 1432-1440.
171. Campbell-Valois, F. X., Sachse, M., Sansonetti, P. J., y Parsot, C. (2015) Escape of actively secreting shigella flexneri from ATG8/LC3-Positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. *MBio* 6 (3): 1-11.
172. Alberti-Segui, C., Goeden, K. R., y Higgins, D. E. (2007) Differential function of Listeria monocytogenes listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cell. Microbiol.* 9 (1): 179-195.
173. Ireton, K. (2013) Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol.* 3 (JUL).
174. Kuehl, C. J., Dragoi, A. M., Talman, A., y Agaisse, H. (2015) Bacterial spread from cell to cell: Beyond actin-based motility. *Trends Microbiol.* 23 (9): 558-566.
175. Miao, Y., Li, G., Xu, H., Abraham, S. N., Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H., y Abraham, S. N. (2015) A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* 161 (6): 1306-1319.
176. Bruna, R. E., Revale, S., García Véscovi, E., y Mariscotti, J. F. (2015) Draft Whole-Genome Sequence of Serratia marcescens Strain RM66262, Isolated from a Patient with a Urinary Tract Infection. *Genome Announc.* 3 (6): e01423-15.
177. Lazzaro, M., Feldman, M. F., y García Véscovi, E. (2017) A transcriptional regulatory mechanism finely tunes the firing of type VI secretion system in response to bacterial enemies. *MBio* 8 (4): 1-17.
178. Flyg, C., y Xanthopoulos, K. G. (1983) Insect Pathogenic Properties Of Serratia Marcescens. Passive And Active Resistance To Insect Immunity Studied With Protease-Deficient And Phage-Resistant Mutants. *Microbiology* 129 (2): 453-464.
179. Casadaban, M. J., y Cohen, S. N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (9): 4530-3.
180. Niu, C., Clemmer, K. M., Bonomo, R. a., y Rather, P. N. (2008) Isolation and characterization of an autoinducer synthase from Acinetobacter baumannii. *J. Bacteriol.* 190 (9): 3386-3392.

181. Carruthers, M. D., Nicholson, P. a., Tracy, E. N., y Munson, R. S. (2013) *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS One* 8 (3).
182. Weber, B. S., Man, P., Irwin, J. N., Pukatzki, S., y Feldman, M. F. (2015) A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. 1-6.
183. Weber, B. S., Hennon, S. W., Wright, M. S., Scott, N. E., Berardinis, V. De, Foster, L. J., Ayala, J. A., Adams, M. D., y Feldman, F. (2016) Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* and Identification of a Novel Peptidoglycan Hydrolase , TagX , Required for Its Biogenesis. 7 (5): 1-17.
184. De Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fèvre, F., Schächter, V., Pezo, V., Döring, V., Scarpelli, C., Médigue, C., Cohen, G. N., Marlière, P., Salanoubat, M., y Weissenbach, J. (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol. Syst. Biol.* 4 (174).
185. Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Walz, T., Joachimiak, A., y Mekalanos, J. J. (2006) A virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus.
186. Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Berón, W., Rabinovitch, M., y Colombo, M. I. (2007) The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell. Microbiol.* 9 (4): 891-909.
187. Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., y Peterson, K. M. (2015) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. 166: 1-2.
188. Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., Von Muhlinen, N., Foeglein, Á., y Randow, F. (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482 (7385): 414-418.
189. Green, M. R., y Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.
190. Lane, D., Prentki, P., y Chandler, M. (1992) Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 56 (4): 509-528.
191. Galas, D. J., Schimitz, A., y Schmitz, a. (1978) DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 5 (9): 3157-3170.
192. Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, a R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (12): 5463-7.
193. Bailey, T. L., y Elkan, C. (1995) The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME.
194. Bailey, T. L., y Gribskov, M. (1998) Methods and statistics for combining motif match scores.
195. Arias, M., y Vogel, H. J. (2017) *Fluorescence and Absorbance Spectroscopy Methods*. 1548: 141-157.
196. Durand, E., Zoued, A., Spinelli, S., Watson, P. J. H., Aschtgen, M. S., Journet, L., Cambillau, C., y Cascales, E. (2012) Structural characterization and oligomerization of the TssL protein, a component shared by bacterial type VI and type IVb secretion systems. *J. Biol. Chem.* 287 (17): 14157-14168.
197. Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., y Mekalanos, J. J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. 103 (5).

198. Macintyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M., y Pukatzki, S. (2010) The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *107* (45): 6-10.
199. Syed, K. A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., Satchell, K. J. F., Yildiz, F., y Klose, K. E. (2009) The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* 191 (21): 6555-6570.
200. Chakraborty, S., Li, M., Chatterjee, C., Sivaraman, J., Leung, K. Y., y Mok, Y. (2010) Temperature and Mg²⁺ Sensing by a Novel PhoP-PhoQ Two-component System for Regulation of Virulence in *Edwardsiella tarda*. *J. Biol. Chem.* 285 (50): 38876-38888.
201. Cho, S., Szewczyk, J., Pesavento, C., Zietek, M., Banzhaf, M., Hov, A., Leverrier, P., Henst, C., Van Der, Roszczenko, P., y Asmar, A. (2014) Detecting Envelope Stress by Monitoring β -Barrel Assembly. *Cell*.
202. Chow, J., y Mazmanian, S. K. (2010) A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 7 (4): 265-276.
203. Ma, A. T., y Mekalanos, J. J. (2010) In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (9): 4365-4370.
204. Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W. C., Carl, M. a., Hood, R. D., Rohmer, L., Tolker-Nielsen, T., Skerrett, S. J., y Mougous, J. D. (2010) Burkholderia type vi secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog.* 6 (8): 77-78.
205. Traven, A., y Naderer, T. (2014) Microbial Egress: A Hitchhiker's Guide to Freedom. *PLoS Pathog.* 10 (7): 7-10.
206. Chieregatti, E., y Meldolesi, J. (2005) Regulated exocytosis: New organelles for non-secretory purposes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2): 181-187.
207. Jaiswal, J. K., Andrews, N. W., y Simon, S. M. (2002) Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J. Cell Biol.* 159 (4): 625-635.
208. Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., y Andrews, N. W. (1997) Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* 137 (1): 93-104.
209. Conte, M. P., Petrone, G., Longhi, C., Valenti, P., Morelli, R., Superti, F., y Seganti, L. (1996) The effects of inhibitors of vacuolar acidification on the release of *Listeria monocytogenes* from phagosomes of Caco-2 cells. *J. Med. Microbiol.* 44 (6): 418-424.
210. Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., y Tashiro, Y. (1998) Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. *Cell Struct. Funct.* 23 (1): 33-42.
211. Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O., y Rubinsztein, D. C. (2008) Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4 (7): 849-850.
212. Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J., y Publicover, S. (2009) Ca²⁺-stores in sperm: Their identities and functions. *Reproduction* 138 (3): 425-437.
213. González-Juarbe, N., Mares, C. a., Hinojosa, C. a., Medina, J. L., Cantwell, A., Dube, P. H., Orihuela, C. J., y Bergman, M. a. (2015) Requirement for *Serratia marcescens* cytolysin in a murine model of hemorrhagic pneumonia. *Infect. Immun.* 83 (2): 614-624.

214. Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V., y Ratner, A. J. (2013) Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2): 173-207.
215. Tran Van Nhieu, G., Dupont, G., y Combettes, L. (2018) Ca²⁺ signals triggered by bacterial pathogens and microdomains. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865 (11): 1838-1845.
216. Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., Van Der Goot, F. G., y Frêche, B. (2008) Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (3): 493-507.
217. Maravall, M., Mainen, Z. F., Sabatini, B. L., y Svoboda, K. (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* 78 (5): 2655-2667.
218. Dong, X. P., Wang, X., y Xu, H. (2010) TRP channels of intracellular membranes. *J. Neurochem.* 113 (2): 313-328.
219. Bischofberger, M., Iacovache, I., y Van Der Goot, F. G. (2012) Pathogenic pore-forming proteins: Function and host response. *Cell Host Microbe* 12 (3): 266-275.
220. Babychuk, E. B., y Draeger, A. (2015) Defying death: Cellular survival strategies following plasmalemmal injury by bacterial toxins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 45: 39-47.
221. Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., y Sebo, P. (2010) RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. 34: 1076-1112.
222. Díaz, D., Bartolo, R., Delgadillo, D. M., Higueldo, F., y Gomora, J. C. (2005) Contrasting effects of Cd²⁺ and Co²⁺ on the blocking/unblocking of human Cav3 channels. *J. Membr. Biol.* 207 (2): 91-105.
223. Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L., y Perez-Reyes, E. (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block α 1H. *Biophys. J.* 77 (6): 3034-3042.
224. Todorovic, S. M., y Lingle, C. J. (1998) Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J. Neurophysiol.* 79 (1): 240-252.
225. Kang, H. W., Park, J. Y., Jeong, S. W., Kim, J. A., Moon, H. J., Perez-Reyes, E., y Lee, J. H. (2006) A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 281 (8): 4823-4830.
226. Eller, P., Berjukov, S., Wanner, S., Huber, I., Hering, S., Knaus, H. G., Toth, G., Kimball, S. D., y Striessnig, J. (2000) High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. *Br. J. Pharmacol.* 130 (3): 669-677.
227. Martin, R. L., Lee, J.-H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., y Hanck, D. A. (2000) Mibefradil Block of Cloned T-Type Calcium Channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
228. Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., y Mikoshiba, K. (1997) 2-Aminoethoxydiphenyl Modulator of Ins(1,4,5)P₃-Induced Borate, a Membrane-Penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-Induced Ca²⁺ release. *J. Biochem.* 122: 498-505.
229. Missiaen, L., Callewaert, G., De Smedt, H., y Parys, J. B. (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺pump and the non-specific Ca²⁺leak from the non-mitochondrial Ca²⁺stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29 (2): 111-116.
230. Goto, J. I., Suzuki, A. Z., Ozaki, S., Matsumoto, N., Nakamura, T., Ebisui, E., Fleig, A., Penner, R., y Mikoshiba, K. (2010) Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca²⁺entry via STIM proteins. *Cell Calcium* 47 (1): 1-10.

231. Gregory, R. B., Rychkov, G., y Barritt, G. J. (2001) Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem. J.* 354 (Pt 2): 285-90.
232. Rogers, T. B., Inesi, G., Wade, R., y Lederer, W. J. (1995) Use of thapsigargin to study Ca²⁺-homeostasis in cardiac cells. *Biosci. Rep.* 15 (5): 341-349.
233. Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., Cibis, I., Bhakdi, S., y Husmann, M. (2009) Biochemical and Biophysical Research Communications Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385 (4): 503-506.
234. Kloft, N., Neukirch, C., Bobkiewicz, W., Veerachato, G., Busch, T., von Hoven, G., Boller, K., y Husmann, M. (2010) Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins. *Med. Microbiol. Immunol.*
235. Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I. S., y Jäättelä, M. (2007) Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol. Cell* 25 (2): 193-205.
236. Gao, W., Ding, W. X., Stolz, D. B., y Yin, X. M. (2008) Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. *Autophagy* 4 (6): 754-761.
237. Grottemeier, A., Alers, S., Pfisterer, S. G., Paasch, F., Daubrawa, M., Dieterle, A., Viollet, B., Wesselborg, S., Proikas-Cezanne, T., y Stork, B. (2010) AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase. *Cell. Signal.* 22 (6): 914-925.
238. Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., O'Kane, C. J., Floto, R. A., y Rubinsztein, D. C. (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* 4 (5): 295-305.
239. Klein, B., Wörndl, K., Lütz-Meindl, U., y Kerschbaum, H. H. (2011) Perturbation of intracellular K⁺-homeostasis with valinomycin promotes cell death by mitochondrial swelling and autophagic processes. *Apoptosis* 16 (11): 1101-1117.
240. Mlinar, B., y Enyeart, J. J. (1993) Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J. Physiol.* 469 (1): 639-652.