



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**“Identificación y caracterización de
compuestos antibacterianos a partir de
productos naturales o semisintéticos”**

Lic. Gastón Viarengo

Rosario, Argentina

2015

“Identificación y caracterización de compuestos antibacterianos a partir de productos naturales o semisintéticos”

Gastón Viarengo

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional del Litoral

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 investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, Departamento de Microbiología, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 2010 y 2015 bajo la dirección de la Dra. Eleonora García Véscovi y la co-dirección del Dr. Ricardo L.E. Furlán.

Dra. Eleonora García Véscovi:

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Defendida:

Tantas personas contribuyeron para que pueda llegar a este punto, que es imposible expresar en resumidas palabras todo mi agradecimiento. Son las personas que estuvieron y están a mi alrededor las que hicieron posible cada parte de este trabajo de tesis.

En primer lugar quiero agradecer inmensamente a mi familia: padres, hermanos, abuelos, tíos y primos. Por querer siempre lo mejor para mí, y por todo el esfuerzo y dedicación que han puesto en mi educación y formación profesional y personal. Por sus invaluable consejos y apoyo en todo momento. Por las reuniones, viajes y encuentros, y por todos los momentos que vendrán. A la Cane, por su alegría apabullante cada vez que vuelvo a casa. Y especialmente a mi mamá, por estar dispuesta a escucharme a cualquier hora, y por sus cálidas palabras y consejos.

A Nanita, por todo lo que ha hecho por mí, por su apoyo, su alegría y su cariño. Y por su dulzura y comprensión inmensas.

A Eleonora, por haber depositado su confianza en mí para la realización de esta tesis. Por su enorme dedicación y estímulo durante la dirección, y por buscar en todo momento incentivar mi espíritu crítico. Por las actividades extra-curriculares compartidas, y por su incansable empuje por fomentar la divulgación y formación científica. A Ricardo, por su co-dirección, por su buena onda y predisposición a todo momento. Por sus sugerencias y por sus clarísimas explicaciones sobre la parte química de esta tesis. A los chicos y chicas de Farmacognosia, por los momentos compartidos, por las charlas sobre cualquier cosa, por los incontables viajes para poder llevar a cabo los experimentos, y por los que vendrán!

A Fernando, por estimular continuamente el pensamiento científico, por estar siempre predispuesto a participar y aconsejar en las discusiones experimentales. A mis tutores, por su preocupación por el avance de esta tesis, por aportar consejos y otras miradas, siempre con gran entusiasmo y cordialidad.

Al Dr. Francisco García-del Portillo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por sus sugerencias y por estar siempre dispuesto a trabajar en conjunto. A los chicos y chicas del laboratorio en Madrid, por haberme

recibido y tratado como si fuera uno más, por ayudarme y responder a mis consultas siempre con muy buena onda. Por los espectaculares momentos vividos, por los paseos y salidas tan divertidos que siempre voy a recordar.

Infinitas gracias a las personas con las que compartí y comparto el laboratorio todos los días. Porque realmente es invaluable poder trabajar todos los días con amigos, rodeado de tanta buena onda, y que, a veces, den ganas de ir pero no de volverse. Por las charlas sobre todos los temas, juntadas y momentos compartidos. Por potenciar los buenos días y diluir los no tan buenos, por su preocupación y su aguante. Por formar un grupo espectacular tanto dentro como fuera del laboratorio!

Un agradecimiento muy especial a Mariela, con su enorme paciencia y dedicación para enseñarme apenas ingresé al laboratorio. Por sus consejos y por responder a todas mis dudas, y por su preocupación en todo momento. A Euge, por la buena onda y también por responder a todas mis inquietudes. A Maru y Allo, que me recibieron con los brazos abiertos y me incluyeron desde un primer momento para que no me sintiera un extraño. Por su preocupación, por escucharme y aconsejarme siempre.

A todos las demás personas con las que comparto el día a día, por las charlas en los pasillos o las anécdotas vividas dentro y fuera del instituto. A los vecinos del Lab8 & Co, por siempre recibirme con alegría y desenchufarme por un rato. A Dani, por las charlas (pseudo)filosóficas, por la tranquilidad que transmite y, sobre todo, por compartir la pasión por la bici. A las chicas del Lab10, por la paz que contagian y por tratarme tan bien durante mi breve estadía.

Y al final, pero no últimos, a mis amigos. De aquí y de allá, los que están cerca y los que no tanto (sólo geográficamente hablando, claro), les estoy eternamente agradecido por los momentos vividos: viajes, deportes, charlas, encuentros, despedidas, reencuentros. Porque siempre es tan poco lo que les brindo respecto a tanto que recibo de ellos. Infinitas gracias a Ber y Rober por todos los ratos compartidos! Por sus consejos y por sus palabras de aliento. Por una amistad que comenzó dentro del instituto y se extendió a todos los demás momentos y lugares.

A mis amigos de Santa Fe, porque a pesar de la “distancia” siguen estando presentes igual que siempre. A los chicos y chicas de Rafa, por los momentos divertidos y las charlas. Por escucharme, y por aportar su otra invaluable mirada.

A Ariel, por bancarme todos estos años en la convivencia y por todas las experiencias compartidas. Por hacer que mis “problemas” siempre parezcan tan ínfimos. Por sus creativas ocurrencias y sus espectaculares anécdotas.

***"No sólo no hubiera sido nada sin ustedes,
sino con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo,
algunos... siguen hasta hoy. Gracias... ¡totales!"***

(Tomado y modificado de: Soda Stereo, El último concierto, 1997)

Parte de los resultados que aquí se describen han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados:

- Salazar MO, **Viarengo G**, Sciara MI, Kieffer PM, García Véscovi E, Furlan RL. *A Thin-layer Chromatography Autographic Method for the Detection of Inhibitors of the Salmonella PhoP-PhoQ Regulatory System*. *Phytochem. Anal.* 2014; 25:155–160. doi: 10.1002/pca.2482

- **Viarengo G**, Sciara MI, Salazar MO, Kieffer PM, Furlán RL, García Véscovi E. *Unsaturated Long Chain Free Fatty Acids Are Input Signals of the Salmonella enterica PhoP/PhoQ Regulatory System*. *J. Biol. Chem.* 2013 Aug 2; 288 (31):22346-58. doi: 10.1074/jbc.M113.472829. **Editor's Choice: M. VanHook, Fatty Acids as Environmental Cues? Science Signaling 6, ec189 (2013)**. doi: 10.1126/scisignal.2004601

Presentaciones a reuniones científicas:

- **Viarengo G**, Giri GF, Furlán RL, Suárez AG; Spanevello RA, García Véscovi E. "Identification of a compound from soybean hull pyrolysate with activity against Salmonella enterica". L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2014. Rosario, Argentina.

- Furlán RL, García Véscovi E, Giri GF, Spanevello RA, Suárez AG, **Viarengo G**. "Represión de la virulencia de Salmonella mediada por carbohidratos provenientes de subproductos agroindustriales". XXII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM). 2014. Valparaíso, Chile.

- **Viarengo G**, Salazar MO, Furlán RL, García Véscovi E. "Unsaturated long-chain free fatty acids are input signals of the Salmonella enterica PhoP/PhoQ regulatory system". IX Congreso de Microbiología General de la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). 2013. Rosario, Argentina.

- **Viarengo G**, Salazar MO, Furlán RL, García Véscovi E. "Identification of a plant extract with inhibitory activity against S. enterica PhoP/PhoQ system". XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2011. Potrero de los Funes, Argentina.

ADN	ácido desoxirribonucleico
AI-2	autoinductor-2
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (análisis de varianza)
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CAMPs	péptidos catiónicos antimicrobianos
Ci	Curie
CMC	concentración micelar crítica
CoA	coenzima A
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
DNasa	desoxirribonucleasa
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionización por electrospray)
ESP	<i>early stationary phase</i> (fase estacionaria temprana)
FAD	flavina adenina dinucleótido
GABA	ácido γ -aminobutírico
h	hora(s)
HQ	histidina quinasa
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IT	trampa iónica
LB	Luria Bertani
LC	cromatografía líquida
LCUFA	ácido graso insaturado de cadena larga
LPS	lipopolisacárido
MALDI	desorción/ionización láser asistida por matriz
MBP	proteína de unión a maltosa
MEP	<i>mid-exponential phase</i> (fase exponencial media)

MHz	megahercio
min	minuto(s)
miRNA	microARN
MS	espectrometría de masa
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	azul de nitrotetrazolio
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
p/v	peso/volumen
PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ppm	partes por millón
PTM	modificación post-traducciona
RMN	resonancia magnética nuclear
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RR	regulador de respuesta
RT-PCR	retro-transcriptasa PCR
SAM	S-adenosil-metionina
SCV	vacuola conteniendo a <i>Salmonella</i>
SDS	dodecilsulfato de sodio
SPI	isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
T3SS	sistema de secreción tipo 3
TBE	buffer Tris Borato EDTA
TBS	buffer Tris salino
TCS	sistema de dos componentes
TE	buffer Tris EDTA
TLC	cromatografía en capa delgada
TM	segmento transmembrana
TOF	tiempo de vuelo
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen

INTRODUCCIÓN	1
<i>INT. 1. El género Salmonella</i>	2
<i>INT. 2. Mecanismos de patogénesis de Salmonella</i>	3
<i>INT. 3. Sistemas regulatorios de dos componentes</i>	10
3. a. Histidina quinasa	14
3. b. Reguladores de respuesta.....	19
<i>INT. 4. El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de Salmonella</i>	22
4. a. Genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ	24
4. b. Estructura de la histidina quinasa PhoQ.....	27
4. c. Señales moduladoras de la actividad del sistema PhoP/ PhoQ	28
Cation divalente Mg ²⁺	28
Péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs):	30
pH:.....	31
<i>INT. 5. Los TCS como blanco terapéutico para agentes antimicrobianos en bacterias patógenas</i>	32
<i>INT. 6. Extractos vegetales como fuente de agentes antibacterianos</i>	35
<i>INT. 7. Compuestos naturales como inhibidores del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de Salmonella enterica</i>	36
<i>INT. 8. Ácidos grasos</i>	38
8. a. Metabolismo bacteriano de los ácidos grasos.....	39
8. b. Los ácidos grasos en la fisiología animal	42
8. c. Bilis, ácidos grasos y virulencia.....	44
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
<i>M&M. 1. Cepas bacterianas y plásmidos</i>	50
<i>M&M. 2. Medios de cultivo y antibióticos</i>	51
<i>M&M. 3. Reactivos</i>	52
<i>M&M. 4. Preparación de ADN plasmídico</i>	53
<i>M&M. 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	53
<i>M&M. 6. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)</i>	53
<i>M&M. 7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	54
<i>M&M. 8. Transformación bacteriana con ADN plasmídico</i>	54
8. a. Preparación de células competentes	54
8. b. Transformación y selección	55
<i>M&M. 9. Transducción mediante el bacteriófago P22</i>	55
9. a. Obtención de lisados de la cepa dadora	55
9. b. Transducción generalizada	56
<i>M&M. 10. Construcción de fusiones transcripcionales a lacZ</i>	56
<i>M&M. 11. Medida de actividad β-galactosidasa</i>	57
<i>M&M. 12. Curvas de crecimiento bacteriano</i>	58
<i>M&M. 13. Fraccionamiento celular</i>	59
13. a. Fraccionamiento para el análisis de la expresión de proteínas.....	59
13. b. Preparación de membranas citoplasmáticas	59

<i>M&M. 14. Purificación de proteínas recombinantes</i>	60
<i>M&M. 15. Determinación de la concentración de proteínas.....</i>	62
<i>M&M. 16. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y reductoras (PAGE-SDS).....</i>	62
<i>M&M. 17. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (“Western blot”).....</i>	63
<i>M&M. 18. Reacción de autoquinasa de PhoQ o EnvZ.....</i>	64
<i>M&M. 19. Análisis de lípidos mediante cromatografía en capa delgada (TLC)</i>	64
<i>M&M. 20. Ensayos de transcriptómica con “microarrays”.....</i>	65
20. a. Extracción de ARN	65
20. b. Tratamiento con DNasa I y purificación de ARN	66
20. c. Ensayos de “microarrays”	66
<i>M&M. 21. Herramientas bioinformáticas.....</i>	67
<i>M&M. 22. Análisis estadístico</i>	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
<u>CAPÍTULO I:</u> CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS SOBRE EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES PHOP/PHOQ DE SALMONELLA ENTERICA	69
<i>R&D. I. 1. Efecto del ácido linoleico sobre el crecimiento de Salmonella.....</i>	71
<i>R&D. I. 2. Identificación del blanco de acción de LCUFAs sobre el mecanismo de transducción de señales del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.....</i>	72
<i>R&D. I. 3. Relación entre la vía de β-oxidación y el efecto inhibitorio de los LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ</i>	79
<i>R&D. I. 4. Caracterización del efecto represor de LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.....</i>	87
4. a. Naturaleza del efecto represor de C18:2.....	87
4. b. Efecto resultante de la combinación de dos ácidos grasos insaturados	88
4. c. Efecto debido a componentes presentes en bilis fisiológica fresca	91
<i>R&D. I. 5. Conclusiones finales.....</i>	94
<u>CAPÍTULO II:</u> BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES REGULADOS POR EL SISTEMA PHOP/PHOQ MEDIANTE ENSAYOS DE MICROARREGLOS	99
<i>R&D. II. 1. Obtención de muestras de ARN y realización de ensayos de microarreglos.</i>	101
<i>R&D. II. 2. Análisis de los resultados del ensayo de microarreglos: conjunto de genes reprimidos por ácido linoleico de manera dependiente de PhoP.....</i>	102
<i>R&D. II. 3. Identificación de genes candidatos potenciales bajo regulación del factor de transcripción PhoP.....</i>	104
3. a. Metabolismo de arginina, glutamato y aspartato.....	105
3. b. Metabolismo de poliaminas	115
3. c. Mecanismo de sensado de la densidad de población celular (quorum sensing) .	119
<i>R&D. II. 4. Validación de los resultados del ensayo de microarreglos</i>	123
4. a. Medidas de actividad transcripcional de fusiones reporteras en los genes de interés.....	125
4. b. Análisis de los niveles de expresión proteica de los blancos de regulación por PhoP.....	129

<i>R&D. II. 5. Conclusiones finales</i>	134
CAPÍTULO III: LA PROTEÍNA SENSORA PHOQ ES MODIFICADA POST-TRADUCCIONALMENTE EN PRESENCIA DE ÁCIDO LINOLEICO	138
<i>R&D. III. 1. Análisis de la banda adicional de PhoQ mediante experimentos de espectrometría de masa (MS)</i>	141
1. a. Purificación de la proteína sensora PhoQ unida a un tag de 6xHis	146
1. b. Análisis por espectrometría de masas realizado en Canadá	151
1. c. Análisis por espectrometría de masas realizado en Uruguay	155
<i>R&D. III. 2. Estudio realizado con variantes quiméricas o truncadas de la proteína sensora PhoQ</i>	158
<i>R&D. III. 3. Conclusiones finales</i>	163
RESUMEN Y CONCLUSIONES	167
<i>R&C. 1. Resumen</i>	168
<i>R&C. 2. Conclusiones generales</i>	171
2. a. Conclusiones del Capítulo 1	171
2. b. Conclusiones del Capítulo 2	172
2. c. Conclusiones del Capítulo 3	172
REFERENCIAS	174



INTRODUCCIÓN



INT. 1. El género *Salmonella*

Salmonella es un género de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son causantes de una amplia variedad de enfermedades en humanos y animales, que abarcan desde gastroenteritis, fiebre entérica, bacteriemia e infecciones localizadas, hasta un estado de portador asintomático. El tipo de infección depende del serotipo de *Salmonella* y de diversos factores del hospedador (1).

El género *Salmonellae* es actualmente clasificado en sólo dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, basado en la alta similitud de secuencia del genoma (96-99%). Existe sólo una subespecie dentro de *S. bongori*, nombrada subespecie V, mientras que *S. enterica* comprende las restantes 7 subespecies, diferenciadas bioquímicamente y por relaciones genómicas: I, *S. enterica* subespecie *enterica*; II, subespecie *salamae*; IIIa, subespecie *arizonae*; IIIb, subespecie *diarizonae*; IV, subespecie *houtenae*; VI, subespecie *indica*; y VII, sin nombre. Mientras que la subespecie I es específica para animales de sangre caliente como los mamíferos, las restantes sólo pueden infectar animales de sangre fría. El CDC (siglas en inglés correspondientes a *Center for Disease Control and Prevention* de los Estados Unidos) utiliza nombres para los distintos serotipos de la subespecie I (por ejemplo, serotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhi y Choleraesuis) y utiliza fórmulas antigénicas para los serotipos no nombrados en las subespecies II, IV, VI y en *S. bongori*. Dentro de estas 7 subespecies, existen actualmente más de 2500 serotipos de *Salmonella* (2-4).

Las cepas en el serogrupo *S. enterica* subesp. *enterica* (*S. enterica*) causan aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. A pesar de que son genéticamente muy semejantes, existe una enorme variación en la virulencia y en la epidemiología de los diferentes serotipos de *S. enterica*. Por ejemplo, *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno exclusivo de humanos, agente causal de la enfermedad sistémica conocida como fiebre tifoidea o entérica. La fiebre tifoidea es un problema global, con más de 27 millones de casos a nivel mundial cada año, resultando en una estimación de 217.000 muertes (5). Los serotipos no tifoideos de *Salmonella* (NTS), como *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), infectan múltiples hospedadores y causan gastroenteritis en humanos, ganado, caballos y otros animales, la cual es autolimitada en hospedadores

previamente sanos, pero es capaz de provocar una infección sistémica en ratones susceptibles, que se asemeja a la fiebre tifoidea. Estos serotipos pueden provocar también una variedad de infecciones extra-intestinales severas, dependiendo de distintos factores predisponentes del hospedador y de diversas características referidas a la virulencia de las distintos serotipos. Las infecciones por serovares NTS causan un estimado de 93,8 millones de casos y 155.000 muertes a nivel mundial cada año (5).

INT. 2. Mecanismos de patogénesis de *Salmonella*

La infección por *Salmonella* generalmente comienza por la ingestión oral a través de agua o alimentos contaminados. Las bacterias que logren sobrevivir al medio gástrico y competir exitosamente con la flora intestinal normal, podrán colonizar el intestino delgado (6).

La penetración de la barrera intestinal es un paso esencial en la patogénesis de *Salmonella*. *S. Typhimurium* atraviesa la barrera intestinal a través de múltiples mecanismos, como ser la invasión de células epiteliales intestinales o de las células M de las placas de Peyer (7, 8). Además, *Salmonella* puede ser llevada desde el tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo por fagocitos que expresan CD18 (9). El hospedador utilizaría las células expresando CD18 del linaje monocito-macrófago para detectar antígenos microbianos gastrointestinales e iniciar respuestas inmunes sistémicas, mientras que las células M controlarían la generación independiente de respuestas inmunes de la mucosa (9). Dentro de las células, *Salmonella* se aloja en una vacuola con características únicas y provoca daño citotóxico al epitelio, induciendo diarrea acuosa (7). En el caso de la gastroenteritis, las bacterias usualmente se limitan al tracto intestinal debido a una infiltración de neutrófilos, consistente con la autolimitación de la enfermedad en adultos inmunocompetentes. Cuando la infección resulta en una enfermedad sistémica, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos intestinales y subsecuentemente diseminadas a través del sistema retículo-endotelial después de haber vencido a la barrera epitelial intestinal (9) (Figura INT.1).

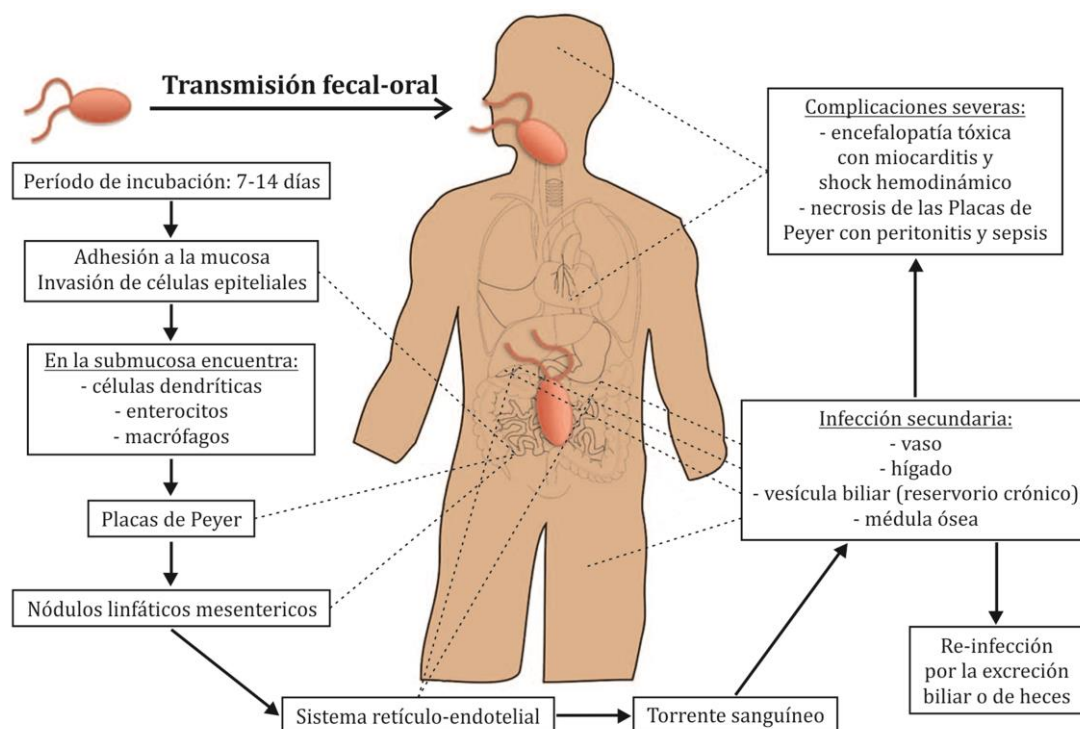


FIGURA INT.1: Diseminación de Salmonella Typhi durante la infección sistémica. La fiebre tifoidea generalmente es contraída por ingestión de agua o alimentos contaminados con heces u orina de portadores que excretan *S. Typhi*. El período de incubación dura usualmente de 7 a 14 días. En el intestino delgado las bacterias se adhieren a la mucosa y luego invaden las células epiteliales. Las Placas de Peyer, que son agregaciones de nódulos linfoides del íleon terminal, juegan un rol importante en el transporte al tejido linfoide subyacente. Las células epiteliales especializadas, como las células M, que recubren estas Placas de Peyer son el probable sitio de internalización de *S. Typhi*. Una vez que han penetrado la barrera mucosa, las bacterias se traslocan a los folículos linfoides intestinales y los nódulos linfáticos mesentéricos, y algunas pasan a las células retículo-endoteliales del hígado y bazo. Durante la fase bacteriémica, las bacterias se encuentran diseminadas por todo el cuerpo. La infección secundaria puede ocurrir en hígado, bazo, médula ósea, vesícula biliar y Placas de Peyer como sitios preferenciales. La vesícula biliar es el principal reservorio durante la infección crónica con *S. Typhi* y la invasión ocurre tanto directamente desde la sangre o por diseminación retrógrada desde la bilis. Es de interés la habilidad de *Salmonella* de formar biopelículas en cálculos biliares, ya que es un factor crítico en el establecimiento de la carga crónica y liberación de *S. Typhi*. Las bacterias que son excretadas en la bilis pueden luego reinvasir las paredes intestinales por el mecanismo descrito previamente o ser excretadas en las heces. Los síntomas clínicos son fiebre, malestar, y molestia abdominal. Los rasgos clínicos como abdomen distendido, hepatomegalia, esplenomegalia, y bradicardia son comunes. Los puntos rosados, las lesiones clásicas de la piel asociadas con la fiebre tifoidea, son relativamente raras y ocurren en el 5%-30% de los casos. Las manifestaciones más severas de la fiebre tifoidea que llevan a la sepsis y muerte son tanto la necrosis de las Placas de Peyer resultando en la perforación del intestino y peritonitis, o una encefalopatía tóxica asociada con miocarditis y shock hemodinámico (5).

La habilidad de *Salmonella* de causar una enfermedad sistémica es dependiente de los mecanismos moleculares bacterianos que gobiernan la supervivencia dentro de los fagocitos profesionales, como los macrófagos (10). Este es un proceso complejo e involucra el sentido del medio en el fagosoma, la alteración de la superficie bacteriana para resistir a la inmunidad innata y la alteración de procesos del hospedador mediante la remodelación del fagosoma, transformándolo en un nicho replicativo bacteriano intracelular (11).

Un número de fenotipos esenciales de virulencia en *Salmonella* han sido mapeados en las denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs), regiones extendidas de ADN que parecen haber sido insertadas en el cromosoma por transferencia horizontal, ausentes en organismos no patógenos relacionadas como *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 (12). En *S. Typhimurium* se han identificado dos islas de patogenicidad: SPI-1, que gobierna la capacidad de la bacteria de ingresar a las células epiteliales (13); y SPI-2, que se requiere para la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos (14). Ambos sistemas están asociados con la replicación intracelular (15) (Figura INT.2).

Cada una de las SPI codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS). Los T3SS son complejos proteicos con múltiples subunidades capaces de inyectar efectores directamente desde el citoplasma bacteriano al citosol de la célula hospedadora. Estos efectores modulan procesos celulares para el beneficio del patógeno, como la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico de membranas, la transducción de señales y la replicación (13, 16, 17). Los T3SS son estructuras especializadas que exhiben secreción dependiente de contacto, y consisten en un complejo con forma de aguja, que permite que las proteínas secretadas pasen a través de las membranas bacterianas interna y externa, y un aparato de exportación o translocon, que crea un poro en la membrana de la célula hospedadora (8).

La SPI-1 participa en ambas formas de enfermedad causada por *Salmonella*, ya sea gastroenteritis o infección sistémica. Lleva a cabo múltiples funciones, que incluyen la citotoxicidad en macrófagos, la invasión a células epiteliales, inflamación y secreción de fluidos en el íleon, y secreción de citoquinas. Los productos codificados en SPI-1 inducen apoptosis en macrófagos, pero ejecutan la función exactamente opuesta en células epiteliales (4).

La SPI-1 contiene los genes para el T3SS-1, que produce una serie de modificaciones dentro del hospedador, cruciales para la invasión de las células no fagocíticas como las células M, y para la activación de respuestas pro-inflamatorias (5). Esta isla de patogénesis contiene 39 genes que codifican para proteínas estructurales del T3SS-1 (operones *inv/spa* y *prg*), proteínas del translocon (SipB, SipC, SipD), algunos efectores (SipA, SptP, AvrA), algunas chaperonas (SicA, InvB, SicP) y cuatro reguladores transcripcionales (HilA, HilC, HilD e InvF). Otros genes

codificando efectores secretados (*sopA*, *sopB*, *sopD*, *sopE*, *sopE2*, *slrP*, *sspH1*, *sspH2*) se localizan en otra región del cromosoma (Figura INT.2) (4, 18). *Salmonella* muestra una expresión diferencial de proteínas a partir de la SPI-1 al colonizar diferentes tejidos, lo que sería importante para aspectos tejido-específicos de la patogénesis bacteriana (19).

Después de la ingesta, *Salmonella* coloniza el intestino e invade enterocitos y células dendríticas en el epitelio intestinal. Las bacterias que alcanzan la submucosa pueden ser internalizadas mediante diferentes mecanismos: por fagocitosis, por invasión activa utilizando el T3SS-1, o por invasión independiente del T3SS usando fimbrias y otras adhesinas de la superficie bacteriana (5). La invasión se inicia por la unión del patógeno a la superficie de las células del hospedador, lo que activa la inserción del translocon del T3SS-1 en la membrana de la célula hospedadora a través de su afinidad por el colesterol. Este contacto bacteria-célula permite la translocación de los efectores del T3SS-1 a la célula del hospedador. El proceso está coordinado con precisión para asegurar que las translocasas (SipB, SipC y SipD) se secreten antes que los efectores (8). El T3SS-1 entrega por lo menos 13 proteínas efectoras a través de la membrana plasmática de la célula hospedadora, como SipA, SopE, SopE2 y SopB (20–23), la mayoría de las cuales está involucrada en rearrreglos del citoesqueleto de actina, iniciando el *ruffling* de la membrana y la macropinocitosis, permitiendo la invasión por *Salmonella* (24). Otros efectores de SPI-1 inducen la secreción de quimioattractantes epiteliales, resultando en la transmigración de neutrófilos (25).

Inicialmente luego de la internalización, *Salmonella* es encerrada en el denominado fagosoma espacioso (SPs), y persiste dentro de estos fagosomas por fusión con macropinosomas u otros SPs. Dentro de los minutos u horas, este fagosoma se encoge y acidifica, formando una vacuola persistente muy próxima con la membrana de la bacteria, denominada vacuola conteniendo a *Salmonella* (*Salmonella containing vacuole*, SCV) (26)). Existen evidencias que muestran que la SPI-1 también tiene un rol importante en los estadios tempranos de la biogénesis de la SCV en células epiteliales (27). El T3SS-1 inyecta algunas proteínas efectoras, como SipA, SipC, SopB/SigD, SodC-1, SopE2, y SptP al citoplasma del hospedador, los cuales causan rearrreglos del citoesqueleto de actina y de la morfología de la SCV, entre otros cambios (Figura INT.2) (5). Esta SCV parece seguir un proceso de maduración

endocítico normal, ya que interactúa con endosomas tempranos, presenta una maduración dependiente de Rab7 y de fosfoinosítidos, se acidifica y adquiere marcadores característicos de endosomas tardíos y lisosomas (26).

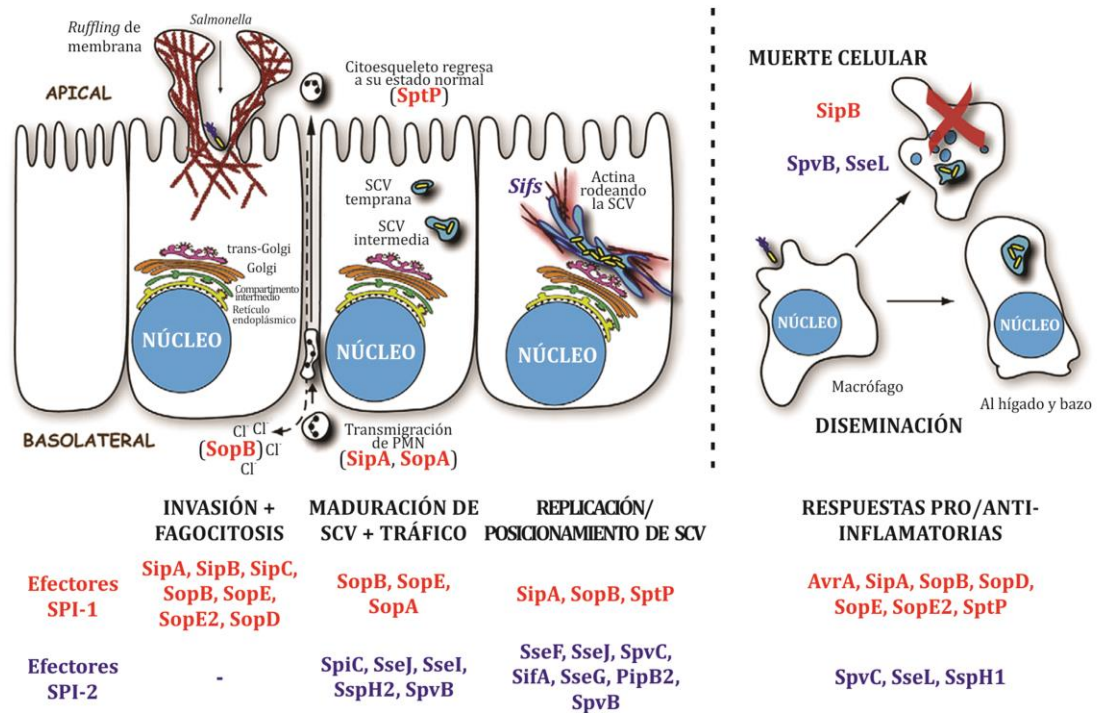


FIGURA INT.2: Representación esquemática de las principales etapas en la infección por *Salmonella*. *Salmonella* invade células no fagocíticas induciendo deformación de la membrana y rearrreglos del citoesqueleto de actina subyacente (*ruffling* de membrana), encerrando las bacterias en compartimentos fagosomales intracelulares denominados vacuola conteniendo a *Salmonella* (SCV). La SCV se dirige hacia la región perinuclear de la célula hospedadora y madura a través de interacciones selectivas con la vía endocítica. Una vez que la SCV se posiciona cerca del aparato de Golgi, comienza la replicación intracelular de las bacterias. Esta etapa está caracterizada por la formación de estructuras tubulovesiculares de la SCV llamados filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs) y la acumulación de actina alrededor del fagosoma bacteriano. La secreción de iones cloruro (Cl⁻) y la trans migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) contribuye a la diarrea e inflamación intestinal. Además, *Salmonella* manipula vías de respuesta inmune específicas del hospedador. Los serovares de *Salmonella* asociados con enfermedad sistémica son capaces de ingresar en los macrófagos intestinales, induciendo la muerte celular así como también utilizándolos como vehículo para diseminarse al hígado y bazo a través de los sistemas linfáticos y sanguíneo. Los efectores de la SPI-1 y SPI-2 involucrados en cada etapa de la infección están indicados en rojo y azul, respectivamente. Notar que los efectores de la SPI-1 y SPI-2 no operan secuencial e independientemente de cada uno, como se pensaba previamente. En cambio, ambos subconjuntos tienen roles clave en la maduración y posicionamiento de la SCV y en la replicación (321).

Salmonella sobrevive y se replica dentro de la SCV, donde es capaz de evitar los mecanismos antimicrobianos del hospedador. La SPI-2 es esencial para la virulencia en una variedad de modelos de ratones y para la replicación intracelular dentro de células en cultivo, epiteliales y macrófagos (15, 28). La formación y mantenimiento de la SCV involucra eventos que son controlados por esta isla de patogenicidad. Los

genes codificados en la SPI-2 no son esenciales para causar gastroenteritis pero son indispensables para la infección sistémica ya que promueven la sobrevivencia intracelular de *Salmonella* dentro de la célula hospedadora (4).

La principal función de la SPI-2 es la de remodelar la vacuola, formando un nicho de replicación intracelular mediante la alteración del tráfico endocítico. Las actividades realizadas por los diversos efectores incluyen la alteración de la fusión entre lisosomas y la SCV (29), la evasión de la muerte de macrófagos dependiente de la NADPH oxidasa (30) y el retraso de la muerte celular similar a la apoptosis (31), la alteración de la membrana vacuolar y la manipulación del citoesqueleto asociado a la SCV (32–34), y la interferencia en la localización de la enzima óxido sintetasa inducible (iNOS) en la SCV (35). Además, SPI-2 confiere protección frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) y a intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) dentro del macrófago. La tetraciónato reductasa está codificada en SPI-2, y es la enzima encargada de convertir tetraciónato en tiosulfato, que actúa como donante alternativo de electrones en ambientes que contienen tetraciónato como el intestino humano o el suelo (4).

Estas diversas actividades implican la existencia de diferentes proteínas efectoras, las cuales están codificadas dentro o fuera de la SPI-2. La expresión del T3SS-2, Spi/Ssa, es regulada por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, y funciona como puerta para el intercambio de materiales entre la SCV y el citoplasma del hospedador (4). La SPI-2 transloca alrededor de 20 proteínas efectoras diferentes a través de la membrana fagosomal dentro del citoplasma de la célula hospedadora, para promover la replicación intracelular y la diseminación sistémica (36). Por ejemplo, SpiC inhibe la fusión endosoma-endosoma *in vitro* (29), y se ha determinado que es necesaria también para la secreción *in vitro* de proteínas de la SPI-2 como SseB, SseC y SseD (37) y para la translocación de efectores de SPI-2 dentro de macrófagos infectados. Las proteínas efectoras SseF y SseG, muestran un rol en la dinámica de la membrana vacuolar, al estar involucradas en la formación de Sifs morfológicamente normales (38). Los Sifs son extensiones tubulares de la membrana de la SCV, probablemente resultado de vesículas brotando de la vía endocítica sin fusión, enriquecidas en glicoproteínas de membrana lisosomal y cuya formación es dependiente de otro efector de la SPI-1, SifA (39) (Figura INT.2).

El ensamble y función de estos T3SS está coordinada espacial y temporalmente. Estudios *in vivo* e *in vitro*, sugieren que *Salmonella* requiere de la expresión de cada uno de sus genes de virulencia sólo en una o en algunas etapas específicas dentro del hospedador. Actualmente, la expresión espacio-temporal de estas dos islas de patogénesis no puede ser demarcada claramente, ya que existe evidencia de superposición en su expresión. Por ejemplo, la expresión preventiva de SPI-2 en el lumen intestinal antes de la invasión a células epiteliales, que prepara a *Salmonella* para atravesar el epitelio hacia la lamina propia así como también para enfrentar el stress intracelular inminente; o la expresión residual de SPI-1 luego de la internalización por macrófagos para contrarrestar la respuesta inmune del hospedador mediante la supresión de la expresión de citoquinas. La expresión ectópica de genes de virulencia puede reducir la capacidad de *Salmonella* de producir una infección, probablemente debido a una respuesta inmune prematura del hospedador. Además, la modulación de la expresión génica compartimento-específica sería importante para minimizar el gasto de energía y recursos (4, 40).

La expresión en tiempo y lugar correctos de las SPI es posible gracias a la capacidad de *Salmonella* de detectar las condiciones ambientales con las que se encuentra dentro del organismo. De este modo, la bacteria es capaz de sentir señales ambientales como por ejemplo pH, baja tensión de oxígeno, alta osmolaridad y alta concentración de hierro, condiciones encontradas en el íleon, sitio preferencial de invasión por este patógeno. En estas condiciones, la expresión de los genes de SPI-1 es activada a través de la expresión de *hilA*. HilA es crucial para la regulación transcripcional de SPI-1, ya que activa directamente la transcripción de los operones *prg*, *inv/spa* y *sip*, que sintetizan componentes estructurales y algunos efectores de T3SS-1, respectivamente. En contraste, cuando *Salmonella* se localiza en sitios desfavorables para la invasión en el organismo hospedador, la presencia de señales como bilis, secretada en el intestino delgado proximal, o péptidos catiónicos, en el interior de macrófagos, inhibe la expresión de T3SS-1 (8, 18).

HilA es regulado directamente por otros reguladores como HilC, HilD y RtsA. Además, un gran número de otros reguladores de *hilA*, actuando principalmente a través de HilD, han sido identificados. Entre ellos se destacan los sistemas denominados de dos componentes (TCS), que permiten detectar las condiciones

ambientales externas y regular la expresión génica mediante la transmisión de diferentes señales al interior celular. Algunos TCS como BarA/SirA y EnvZ/OmpR son capaces de activar indirectamente la expresión de *hilA*, mientras que otros como PhoP/PhoQ y PhoB/PhoR la reprimen. Además, Hile ha sido identificado como un regulador negativo de la transcripción de *hilA* a través de la inhibición de la actividad de HilD (41, 42). Por otra parte, se ha sugerido que los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PhoB/PhoR actúan a través de Hile para regular la expresión de SPI-1 (18, 43).

INT. 3. Sistemas regulatorios de dos componentes

La vida en el mundo microbiano está caracterizada por una continua interacción entre las células bacterianas y el ambiente (44). Debido a la organización unicelular de los procariotas, los cambios ambientales, sean bióticos o abióticos, son rápidos y dramáticos, mientras que los eucariotas pueden amortiguarlos debido a su organización multicelular (45). El ambiente en el que se encuentran los microorganismos cambia constantemente debido a variaciones en parámetros fisicoquímicos como temperatura, luz, presión de oxígeno, acidez, osmolaridad, humedad, y niveles de nutrientes y toxinas (45, 46). Sin embargo, las bacterias son organismos muy adaptables, capaces de crecer en diversas fuentes de carbono y nitrógeno y de ocupar una gran variedad de nichos ecológicos. La clave para la adaptabilidad de estos microorganismos es su capacidad de expresar sólo aquellos genes que codifican para las enzimas y vías que necesitan para un óptimo crecimiento en el nicho en el que se encuentran (47). Entonces, para una exitosa competencia y supervivencia en el hospedador o en el ambiente, las bacterias deben responder a estas condiciones alteradas, adaptando su estructura, fisiología y comportamiento (44, 46, 48). Esto se logra gracias a la habilidad que poseen los microorganismos de reconocer la composición del ambiente en el que se encuentran, mediante la detección de señales provenientes de él (47).

En este sentido, los sistemas de transducción de señales funcionan como vías intracelulares de procesamiento de la información, que unen el estímulo externo a una respuesta adaptativa específica. Mientras que los organismos superiores, como plantas y animales, poseen respuestas adaptativas que incluyen comportamientos

complejos como migración o adaptación a lo largo de generaciones, los organismos de orden inferior o microorganismos unicelulares, como bacterias y levaduras, deben utilizar otras estrategias. La adaptación bacteriana ocurre a nivel: de genes y proteínas individuales, de regulones globales, de células completas (a través de motilidad o esporulación), o a nivel multicelular (por ejemplo a través del mecanismo de sensado de la densidad celular o *quorum sensing*, y mediante la formación de biofilm) (49).

La forma predominante de transducción de la señal utilizada por las bacterias para responder a las condiciones ambientales son los sistemas denominados de dos componentes (TCS) (44, 45, 47, 50, 51). Los TCS son sistemas de sensado, reconocimiento y transducción de la señal, que permiten a un microorganismo procesar y responder a múltiples señales rápidamente (52). Estos sistemas funcionan utilizando la fosforilación reversible de proteínas como estrategia de señalización.

Los TCS están ampliamente distribuidos, aunque no de manera ubicua, en bacteria Gram(+) y Gram(-) y en arqueas. Por ejemplo, un sondeo de genomas secuenciados ha identificado 62 proteínas de TCS en *Escherichia coli*, 27 en *Streptococcus pneumoniae*, 70 en *Bacillus subtilis*, 24 en *Methanobacterium thermoautotrophicum*, pero ninguna en *Mycoplasma genitalium* y *Methanococcus jannaschii*. Estos sistemas están presentes también en hongos, levaduras, plantas y en la ameba *Dictyostelium*, pero hasta el momento no han sido identificadas proteínas pertenecientes a la familia de los TCS en animales, y no están codificadas en los genomas de los humanos, moscas o gusanos (48).

Si bien existen numerosos y variados TCS, los mismos son esquemas modulares constituidos alrededor de un mecanismo central que involucra diferentes arreglos de dominios conservados dentro de las proteínas, y diferente integración de las proteínas en las vías de señalización, lo que provee adaptaciones del esquema básico para lograr las necesidades regulatorias específicas de los diferentes sistemas de señalización (50). No obstante, los TCS prototípicos sirven para ilustrar el mecanismo fundamental de fosfotransferencia que forma el centro de los sistemas simples o más complejos.

El esquema básico de los TCS se estructura alrededor de dos proteínas conservadas: una proteína histidina quinasa (HQ) y una proteína reguladora de la

respuesta (RR) (Figura INT.3). Además de los dominios conservados, las HQ y los RR típicamente contienen dominios variables específicos para el sistema en el que funcionan. Las HQ son generalmente proteínas transmembrana que funcionan como sensores, con dominios extracelulares variables involucrados en sensor los diferentes estímulos. Por su parte, los RR son usualmente proteínas multidominio con dominios efectores variables que provocan una respuesta. En la mayoría de los sistemas, la respuesta es la regulación de la expresión génica, pero algunos RR controlan respuestas más diversas como la regulación de la motilidad, la activación de cascadas de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la modulación de los niveles de nucleótidos cíclicos, o también enzimas o dominios de otros tipos pueden ser controlados (48, 53).

La proteína sensora HQ consiste en un dominio de reconocimiento de la señal con especificidad única, acoplado a un dominio autoquinasa (53). Cuando el estímulo o señal es detectado por el dominio sensor, se cataliza la autofosforilación ATP-dependiente de un residuo de histidina (His) conservado en el dominio de dimerización de la HQ, produciendo un enlace fosforilo de alta energía (His-P). La HK fosforilada es reconocida por un RR específico, y el dominio regulatorio conservado de éste cataliza la fosfotransferencia desde His-P en la HQ a un residuo aspártico (Asp) conservado en el RR, creando un enlace acil-fosfato de alta energía (Asp-P) (52). Normalmente, los dominios regulatorios inhiben los dominios efectores del RR, y la fosforilación del residuo Asp-P libera esta inhibición, permitiendo que el dominio efector ejerza su respuesta (Figura INT.3) (53). Entonces, la respuesta del sistema es determinada por los niveles de RR fosforilado (48, 50).

Existen diversos mecanismos que regulan los niveles de RR fosforilado. Los RR pueden poseer una actividad auto-fosfatasa que limita el tiempo de vida de su estado fosforilado. Esta actividad difiere sustancialmente en diferentes RR. Los diferentes tiempos de vida media de los RR fosforilados, de segundos a horas, refleja las necesidades específicas de cada vía de señalización y otras estrategias regulatorias de cada sistema. En algunos sistemas, existen fosfatasas auxiliares o proteínas que refuerzan la actividad fosfatasa del RR, acelerando su defosforilación. Muchas HQ, además de la actividad de quinasa, también poseen actividad fosfatasa. Ambas actividades pueden ser reguladas directamente por el estímulo (en el caso de las HQ

transmembrana) o indirectamente por la interacción con proteínas auxiliares (en el caso de las HQ citoplasmáticas). Existe una regulación aún más compleja en sistemas donde existen interacciones de múltiples HQ o RR con un único RR o HQ, respectivamente (48, 50).

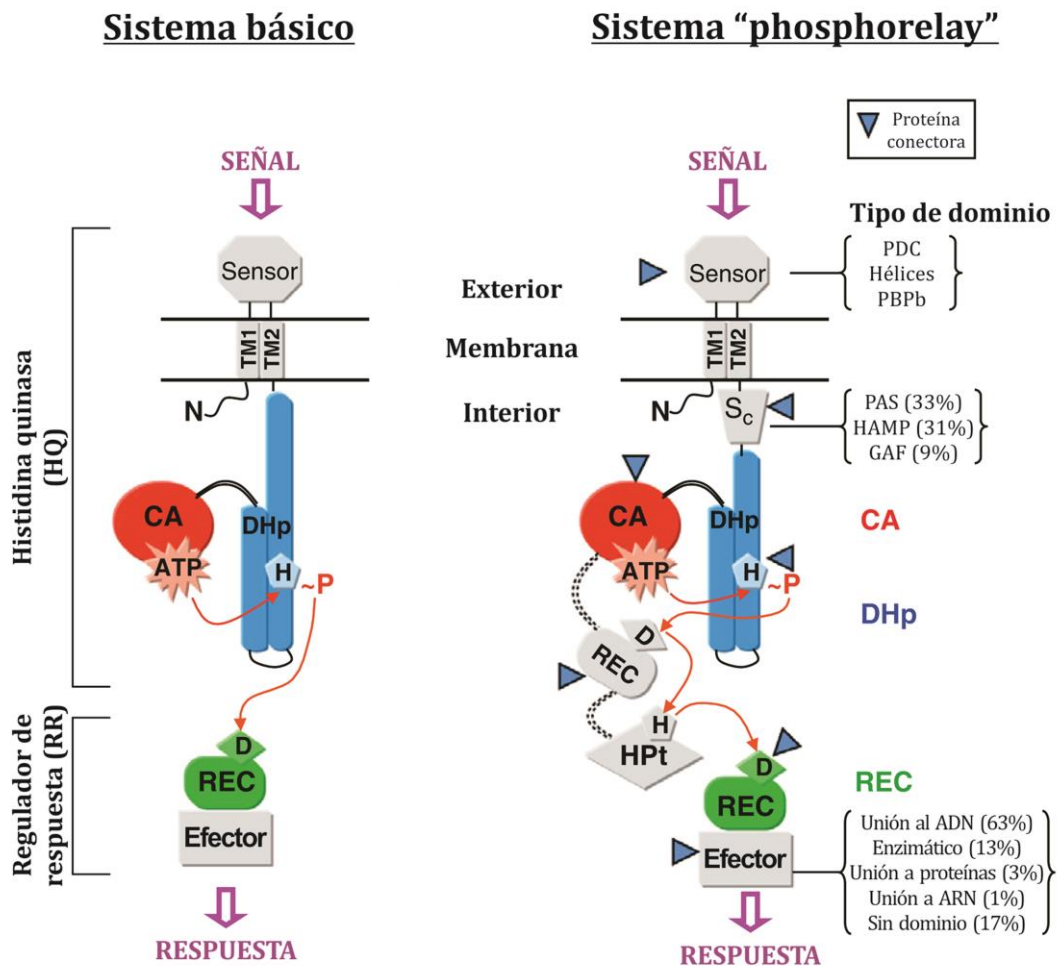


FIGURA INT.3: Organización de dominios y señalización en TCS. *Izquierda:* Sistema básico conformado por un RR compuesto por dominios REC y efector, y una HQ anclada a membrana compuesta por un dominio sensor, dos hélices transmembrana (TM1 y TM2) y los dominios DHp y CA, mostrando el ATP unido y los residuos His (H) y Asp (D) fosforilables. El recorrido del grupo fosforilo (P) entre el ATP y His, y entre His y Asp en la reacción de fosfotransferencia es simbolizado con flechas rojas. *Derecha:* Sistema más complejo de "phosphorelay". La complejidad proviene de la incorporación de un dominio sensor citosólico (Sc) a continuación de las hélices transmembrana, la adición de dominios REC y HPt unidos covalentemente a continuación del dominio CA, y la representación de potenciales proteínas conectoras auxiliares (triángulos) acopladas a sus dominios blanco. Cuando un dominio es variable, las variantes más comunes se detallan junto con la frecuencia de ocurrencia (51).

Como se mencionó previamente, existen diversos TCS pero hay dos arquitecturas básicas predominantes. La vía de fosfotransferencia más simple es la que involucra una proteína histidina quinasa (HQ) y una proteína reguladora de la

respuesta (RR), que participan en una fosfotransferencia His→Asp de un paso (Figura INT.3.izquierda). Una versión más compleja de este esquema son los denominados sistemas de “phosphorelay”, que involucran múltiples dominios conteniendo His y Asp, y una fosfotransferencia His→Asp→His→Asp en tres pasos (Figura INT.3.derecha) (48). La mayoría de los “phosphorelays” involucra HQ híbridas en las cuales tanto los dominios conteniendo His como Asp están presentes en una misma proteína. Las proteínas de fosfotransferencia conteniendo His fosforilable (HPT) juegan un rol crucial en la transferencia de los grupos fosforilo desde las HQ híbridas a los RR citoplásmicos, ya sea desde el ATP unido a la HQ o desde un Asp-P de un dominio RR en la HQ, y transfiriéndolos a dominios RR posteriores en la vía. Estos sistemas expandidos de “phosphorelay” brindan mayor versatilidad en las estrategias de señalización y un mayor número de potenciales sitios de regulación (50). Estos sistemas son característicos en la regulación de procesos metabólicos complejos como la esporulación en *Bacillus subtilis* (54), el control del ciclo celular en *Caulobacter crescentus* (55), y la osmoregulación en *Saccharomyces cerevisiae* (56).

En procariotas, los sistemas de señalización de dos componentes más frecuentes son los que presentan un esquema simple de fosfotransferencia, mientras que los sistemas de “phosphorelay” predominan en la señalización mediante dos componentes en eucariotas (48).

Las proteínas que conforman los sistemas de dos componentes fueron identificadas por primera vez hace 30 años a partir de similitudes en las secuencias, mucho antes de que se sus actividades bioquímicas fueran asignadas a los productos génicos. Extensos estudios genéticos, bioquímicos y estructurales de las HQs y los RRs realizados hasta el momento han establecido las características fundamentales de la señalización por dos componentes.

3. a. Histidina quinasa

La HQ es el nexo primario entre el medio celular y la respuesta adaptativa en la transducción de la señal mediante los sistemas de dos componentes. La gran mayoría de las HQ son proteínas homodiméricas unidas a membrana que usualmente pueden dividirse en dos dominios: un dominio N-terminal sensor periplásmico seguido de un

dominio C-terminal quinasa citoplásmico, generando moléculas transductoras adaptadas a los requerimientos específicos de cada vía de señalización particular. Algunos sistemas de dos componentes utilizan HQ solubles, reguladas por estímulos intracelulares y/o interacción proteína-proteína con otros componentes citoplasmáticos (45).

Los dominios sensores de las HQ muestran una alta variabilidad, tanto en su tamaño como en su secuencia aminoacídica, siendo diseñados para interactuar específicamente con la variedad de estímulos que detectan. Los mismos pueden presentar una localización extracelular, intracelular y/o transmembrana (57).

En las HQ que poseen un **dominio extracelular**, el dominio sensor está conectado al dominio quinasa citoplasmático por una o más hélices transmembrana, que en algunos casos pueden estar seguidas de un dominio de unión. La mayoría de las secuencias extracitoplasmáticas no han sido agrupadas en familias dada su baja conservación de secuencias. En los últimos años, se han resuelto las estructuras de varios dominios periplásmicos de unión a ligando, como el receptor quimiotáctico Tar de *E. coli* (58), la HQ PhoQ de *S. Typhimurium* (59), el sensor LuxQ de *Vibrio harveyi* (60), y los dominios sensores CitA y DcuS de citrato y fumarato de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente (61, 62) (Figura INT.4).

Se han identificado **dominios sensores citoplasmáticos** en numerosas HQs, como los dominios PAS y GAF (63, 64). Se ha mostrado que ambos poseen estructuras similares, caracterizadas por la presencia de un bolsillo de unión a ligando con cinco o seis láminas β anti-paralelas rodeadas de varias hélices α , respectivamente (64), que puede acomodar una variedad de pequeñas moléculas tales como hemo, flavina, adenina, guanina y ftopigmentos.

Otro elemento citoplasmático del complejo sensor es el dominio HAMP (*H*istidine *k*inases, *A*denylate *c*yclases, *M*ethyl *a*ccepting *p*roteins y *P*hosphatases), que inicialmente se creía que estaba involucrado únicamente en el proceso de transducción de la señal más que en la percepción del estímulo (57). La gran mayoría se encuentra localizado C-terminal a una hélice transmembrana (Figura INT.4) por lo que cualquier cambio conformacional al unirse el ligando al dominio periplásmico, debería ser directamente transmitido a través de este dominio. Se ha resuelto la estructura del dominio HAMP de *Archaeoglobus fulgidus* en solución (65). La

estructura revela una arquitectura dimérica y 4 hélices α paralelas. Se ha sugerido que la actual función de este dominio debe ser la de transducir los cambios percibidos en los elementos de señalización superiores a una rotación de las cuatro hélices.

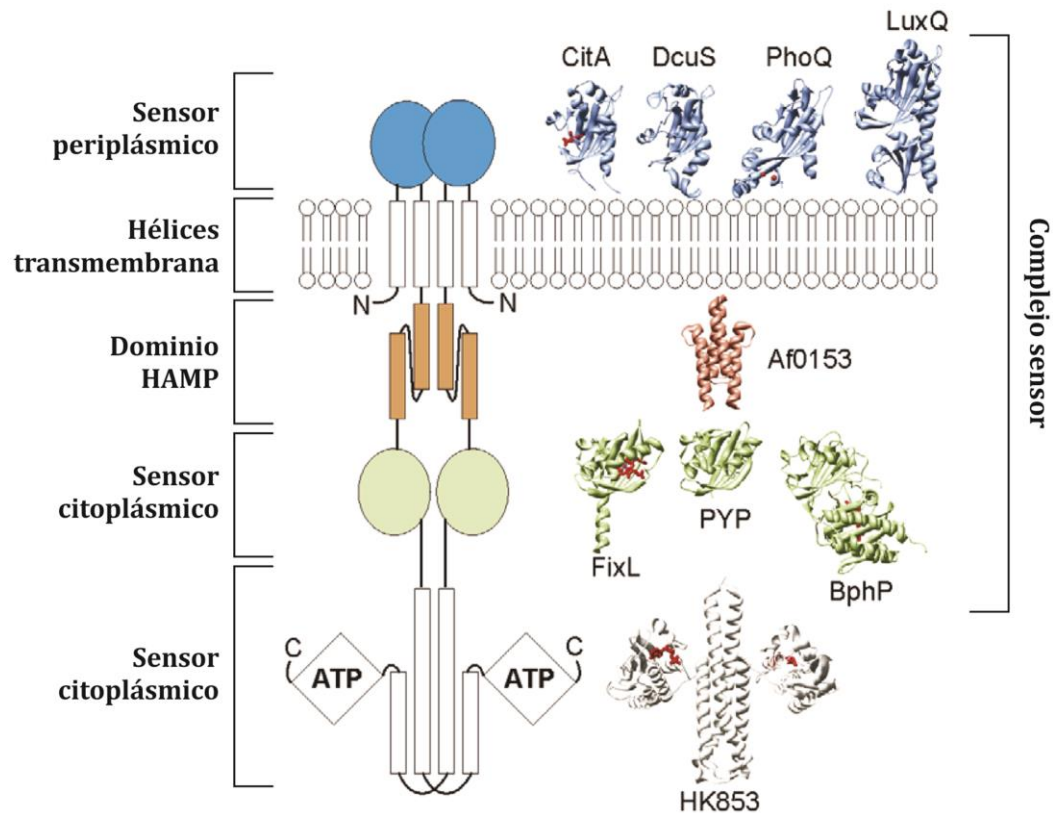


FIGURA INT.4: Arquitectura modular de las histidina quinasa. La HQ sensora es una gran proteína modular consistente en un núcleo catalítico conservado en el extremo C-terminal, y varios elementos opcionales en el extremo N-terminal involucrados en el sensado de la señal o en la transmisión de un cambio conformacional hacia el núcleo catalítico. Los ejemplos de las estructuras son, de izquierda a derecha y de arriba a abajo: los dominios sensores periplásmicos de CitA, DcuS, PhoQ y LuxQ; el dominio HAMP de la proteína AF1503 de *Archaeoglobus fulgidus*; los dominios sensores citoplásmicos de FixL, la proteína amarilla fotoactiva PYP, y el bacteriocitocromo BphP; y el núcleo catalítico de SK853 comprendiendo el dominio catalítico y de unión a ATP (57).

Los **dominios integrales de membrana** también pueden exhibir propiedades sensoras. El primer dominio de membrana descrito con función sensora es el dominio de unión a etileno ETR1 en *Arabidopsis*. ETR1 contiene un dominio hidrofóbico N-terminal que une etileno y un dominio C-terminal con homología a las HQ. De acuerdo al modelo estructural, las hélices α que atraviesan la membrana coordinan un ión de Cu^{+1} . Se ha propuesto que la unión del etileno al metal de

transición induce un cambio conformacional en el dominio sensor que se propagaría a la región citoplásmica de la proteína, modulando su actividad (66).

Por último, las actividades de algunos dominios sensores están reguladas por **proteínas auxiliares** que pueden interactuar con la HQ para formar un complejo sensor o transmitirle la detección de algún ligando (57, 67).

Los dominios sensores son heterogéneos en cuanto al tamaño y la secuencia, reflejando la variedad de estímulos ambientales detectados. En cambio, los dominios quinasas, con los que el RR debe interactuar, son de tamaños similares y altamente conservados.

Estudios bioquímicos y de mutagénesis han mostrado que el dominio quinasa cataliza una reacción de trans-autofosforilación ATP-dependiente en la que un monómero de la HQ fosforila un residuo His conservado en un segundo monómero dentro del dímero de HQ. El grupo fosfoimidazol resultante presenta un enlace N-P de alta energía, haciendo que el equilibrio de la reacción de autofosforilación favorezca al estado defosforilado de la proteína, lo que resulta ideal para la donación del grupo fosforilo al residuo Asp en una cadena lateral del RR (45).

El dominio quinasa es diferente al de cualquier otra quinasa previamente caracterizada, definiéndose a las HQ como una nueva familia de proteína quinasas. Sin embargo, existen similitudes entre la topología del dominio catalítico y una familia de ATPasas que ahora ha sido designada como GHKL (denominada así por los miembros *DNA girase B*, *Hsp90*, *CheA histidine kinase* y *MutL*), caracterizadas por un plegamiento común de unión e hidrólisis de ATP, que ha sido evolutivamente adaptado a funciones biológicas diferentes (68).

El rasgo característico de las HQ es el núcleo quinasa. Esta región de la proteína incluye dominios independientes de dimerización y catalíticos, y es responsable de unir ATP y dirigir la reacción de trans-autofosforilación. Esta región núcleo está definida por cinco motivos conservados de aminoácidos, designados cajas H, N, G1, F, G2 y G3 (Figura INT.5). La caja H contiene el residuo His conservado que es el sitio de fosforilación. Las cajas N, G1, F, G2 y G3 comprenden el bolsillo de unión a ATP (48).

En base a la organización de sus dominios de dimerización y catalíticos, las HQ pueden agruparse en dos tipos (Figura INT.5). En las HQ de tipo I, ejemplificadas por EnvZ, la His conservada se localiza dentro del dominio de dimerización (dominio DHp, *Dimerization Histidine phosphotransfer*), adyacente a la región catalítica y de unión de ATP (dominio CA, *catalytic ATP-binding*) que posee las cinco cajas restantes. En las quinasas de tipo II, la caja H se localiza en un dominio HPt (*Histidine-containing Phosphotransfer*) que está distante del dominio CA y posee inserciones de otros dominios entre ellos. Es interesante destacar que CheA es la única representante de esta categoría (69).

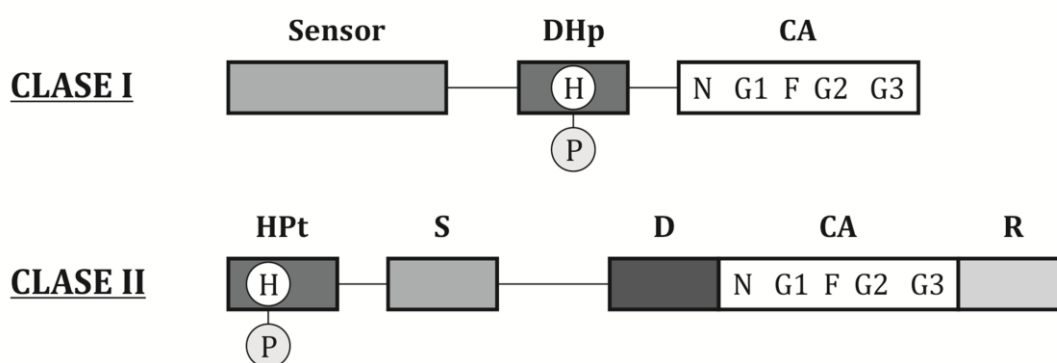


FIGURA INT.5: Histidina quinasas de clase I y clase II. Se muestra un esquema de las dos clases de HQ. Esta clasificación está basada en la posición en la secuencia primaria de la región conteniendo la histidina conservada (H) respecto al dominio quinasa (que contiene las cajas conservadas N, G1, F, G2 y G3). En las HQ de clase I, el residuo His en la caja H del dominio DHp es el sitio primario de autofosforilación. En las HQ de clase II, el residuo H conservado se localiza en la caja H del dominio HPt. Abreviaturas: DHp, dominio de dimerización; CA, dominio catalítico y de unión a ATP; HPt, dominio conteniendo la H fosforilable; S, dominio de unión a sustrato; D, dominio de dimerización; R, dominio regulatorio (69).

La naturaleza dimérica y multimodular de las HQ, que contienen dominios bisagra altamente flexibles, ha dificultado los estudios estructurales. Sin embargo, el hecho de poder expresar y purificar en forma funcional los diferentes sub-dominios ha permitido la resolución estructural por resonancia magnética nuclear (RMN) de los dominios independientes de dimerización y catalíticos de la HQ ortodoxa EnvZ de *E. coli* (70, 71). El sensor de osmolaridad EnvZ y su RR asociado OmpR, regulan la expresión de los genes que codifican para las principales porinas de membrana externa, OmpC y OmpF, en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio. La región citoplásmica de EnvZ consiste en dos sub-dominios funcionales complementarios: un dominio de dimerización (DHp) que contiene la His fosforilable

y un dominio CA. Del mismo modo, las estructuras de los subdominios tales como el subdominio catalítico de las HQ PhoQ (72) y NtrB de *E. coli* (73) y los dominios HPt de ArcB (74), YojN (75) y YPD1 (76) han sido elucidados utilizando RMN y difracción de rayos X. Además, se conocen las estructuras completas de la HQ atípica CheA (77) y de la fosfotransferasa Spo0B (78).

3. b. Reguladores de respuesta

Los RR se encuentran en el final de las vías de fosfotransferencia, donde regulan la respuesta efectora, activados por la fosforilación. La mayoría de los RR posee una estructura de dos dominios: un dominio regulatorio N-terminal conservado y un dominio efector C-terminal variable. La fosforilación de un residuo Asp conservado en el dominio regulatorio resulta en un cambio conformacional creando un RR activo, capaz de permitir una respuesta intracelular, usualmente la expresión génica (48). Entre las proteínas de señalización, los RR son únicos en utilizar la fosforilación de un Asp para la regulación.

El **dominio regulatorio** es un dominio conservado, constituido por un plegamiento conservado $(\alpha/\beta)_5$ que consiste en cinco láminas β paralelas centrales flanqueadas en ambas caras por hélices α anfipáticas. Este dominio cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde un residuo His conservado en la HQ asociada a uno de sus propios residuos Asp, localizado dentro de un bolsillo ácido expuesto en su superficie. El dominio regulatorio sufre cambios estructurales dinámicos con la fosforilación, pasando desde una conformación inactiva a una activa (30). La activación resulta en sutiles cambios conformacionales que se localizan primeramente en la cara α_4 - β_5 - α_5 de la superficie del dominio regulatorio (79, 80). Consecuentemente, diferentes zonas de esta interfase influyen en los dominios efectores asociados, ya sea por interacción directa (81–83) o por formación de dímeros (84). La proteína quimiotáctica que carece de dominio efector, CheY, ha servido como modelo representativo de los dominios regulatorios de los RR (85).

Estos dominios conservados no son componentes pasivos en la fosfotransferencia desde las HQ o los dominios HPt, sino que catalizan la transferencia del grupo fosforilo. Esto se evidenció a partir de la capacidad de

pequeñas moléculas dadoras de fosfato como el acetil-fosfato o el fosfamiridato, de sustituir a la HQ en ensayos de fosfotransferencia *in vivo* e *in vitro* (86–88). El hecho de que el grado de fosfotransferencia desde los residuos His y los dominios HPt de las HQ fuera mayor que desde las moléculas dadoras de fosfato, sugirió la existencia de un alineamiento apropiado del grupo fosforilo debido a un reconocimiento de determinantes en ambos componentes que promovería la fosfotransferencia.

Una pregunta central en el mecanismo de señalización es cómo la función del dominio efector es modulada por la fosforilación del dominio regulatorio. Estudios genéticos, bioquímicos y biofísicos han permitido determinar la estructura de diferentes dominios regulatorios de RR fosforilados o activados. Estos estudios han confirmado la noción que la fosforilación del Asp en el sitio activo provoca pequeños reposicionamientos de la estructura secundaria ligados a una reorientación de un grupo de cadenas laterales específicas, llevando a una modificación estructural que se propaga a través de la molécula (48, 89, 90).

Las diferencias estructurales entre el dominio regulatorio defosforilado y fosforilado afectan una gran superficie del RR y varían en los diferentes RR, en cuanto a magnitud y superficie alterada. Sin embargo, en todos los casos los cambios estructurales se propagan casi exclusivamente a la mitad C-terminal del dominio regulatorio y la superficie que sufre la alteración estructural corresponde a superficies que participan en la interacción proteína-proteína. Estos y otros datos avalan la hipótesis de que los RR existen en equilibrio entre dos conformaciones predominantes, correspondientes a los estados activo e inactivo. La fosforilación lleva el equilibrio hacia una conformación activa. La activación altera la gran superficie molecular del dominio regulatorio, parte de la cual dictamina interacciones proteína-proteína específicas, que median la respuesta efectora. Además, existe gran versatilidad en el modo en que ese cambio conformacional regula la actividad del dominio efector. En algunos casos, la fosforilación promueve la dimerización que es requerida para la unión al ADN, aumenta la unión al ADN en ausencia de dimerización o es requerida para una interacción productiva con la maquinaria transcripcional. En otros RR, la fosforilación induce un cambio conformacional que libera un efecto autoinhibitorio o puede modificar su capacidad de interacción con otras proteínas (53, 91).

Los **dominios efectores** son de estructura y función diversa, dictando a su vez una gran variedad de respuestas efectoras mediante diferentes mecanismos para regular sus actividades.

La función más comúnmente observada de los RR es la de regular la expresión génica. La gran mayoría de los RR son factores transcripcionales que pueden dividirse en tres subfamilias en base a la homología del extremo C-terminal de unión al ADN del dominio efector. Estas subfamilias son designadas según miembros representativos de cada una: OmpR (plegamiento del tipo hélice-giro-hélice, HTH “alado”) (92); NarL (dominios con cuatro hélices α característico) (81); y NtrC (dominio de unión a ATP cuya actividad ATPasa se requiere para su unión al ADN) (93). A pesar de existir plegamientos comunes, las interacciones con la maquinaria transcripcional y los mecanismos de activación difieren dentro de cada subfamilia.

Además de los RR con dominios de unión al ADN se ha descrito el RR AmiR de *Pseudomonas aeruginosa* con un dominio de unión a ARN (94). El dominio efector puede incluso estar en otra proteína o complejo de proteínas, como en el caso de CheY. Esta proteína es un RR asociado a la quimiotaxis que carece de un dominio efector y une el componente del motor flagelar FliM, produciendo una modificación en el sentido de giro del flagelo bacteriano (95). Algunos pocos RR poseen dominios efectores con funciones enzimáticas. Estos reguladores combinan el dominio N-terminal fosfoceptor del tipo CheY con dominios metilesterasa, como CheB (96), con dominios GGDEF y EAL con actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, respectivamente (97), u otros con potenciales actividades enzimáticas aún desconocidas (63).

Los rearrreglos estructurales de las HQ sensoras en la unión del ligando y los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación de los RR forman parte de un mecanismo fundamental para la propagación de la señal dentro de las células. A pesar de que el mecanismo de fosfotransferencia es común a todos los sistemas de dos componentes, la versatilidad de estos sistemas es resultado del diseño modular y la regulación multifacética del estado fosforilado de los RR.

INT. 4. El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella*

El sistema ortodoxo de dos componentes PhoP/PhoQ de *S. Typhimurium* está conformado por la proteína PhoQ, un sensor transmembrana con actividad bifuncional histidina quinasa/fosfatasa, y el regulador de respuesta PhoP (98).

La histidina quinasa PhoQ se encuentra formando un dímero en la membrana interna bacteriana. Posee dos regiones transmembrana, resultando en un dominio sensor periplásmico y un dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico contiene un subdominio linker HAMP próximo a la membrana, un sitio conservado de autofosforilación (caja H en el subdominio DHp) y un dominio C-terminal que une ATP para llevar a cabo las actividades quinasa y fosfatasa (subdominio CA). En respuesta a señales ambientales específicas, la proteína se trans-autofosforila dentro del dímero en un residuo His conservado en el dominio citoplásmico, y el fosfato es subsecuentemente transferido a un residuo Asp en el regulador de respuesta PhoP. PhoP fosforilada se une al ADN para controlar la expresión de los denominados genes activados (*pag*) o reprimidos (*prg*) por PhoP (99). La fosforilación promueve la unión de PhoP a sitios de unión en tándem denominados caja PhoP, que consisten en dos repeticiones directas de la secuencia (G/T)GTTTA(A/T) separada por cinco nucleótidos, localizada entre 25 y 42 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (100).

La proteína PhoQ es un sensor para Mg^{2+} extracelular (101). El crecimiento de la bacteria en un medio con una concentración milimolar de Mg^{2+} reprime la transcripción de los genes activados por PhoP, mientras que el crecimiento en concentraciones micromolares del catión resulta en la transcripción de los mismos.

Este TCS es un regulador maestro de la virulencia de *S. Typhimurium*. El regulón controlado por este TCS incluye genes que son críticos para la homeostasis de Mg^{2+} (99) y aquellos que provocan modificaciones en el LPS, lo que determina la susceptibilidad de la bacteria a péptidos catiónicos antimicrobianos (99, 102–104). El sistema PhoP/PhoQ también está involucrado en el mecanismo de ingreso de la bacteria a la célula del hospedador, modulando la expresión del inyectisoma y de los efectores translocados (105–107). Una vez dentro de la célula, los genes regulados por PhoP contribuyen a definir la sobrevivencia intracelular de *Salmonella*, estando

implicados en la capacidad de proliferación intravacuolar de la bacteria y en el tráfico divergente de la SCV de la vía endocítica canónica (108–110).

El hallazgo de la importancia del locus *phoPQ* en la virulencia de *Salmonella* se remite a experimentos efectuados por Fields y cols. (10, 111), quienes detectaron mutantes transposicionales incapaces de sobrevivir en macrófagos y demostraron que éstas poseían una muy alta dosis letal media (LD50) en ratones. Se encontró además, que estas mutantes eran sensibles a extractos de gránulos provenientes de neutrófilos humanos, macrófagos de ratón y a péptidos antimicrobianos. Éstas mutaciones fueron mapeadas en el locus *phoP* (111), originalmente descrito por Kier y cols. (112).

El locus *phoPQ* se encuentra presente tanto en bacterias Gram negativas patógenas como no patógenas (113, 114). Si bien fue primero analizado en profundidad en *S. Typhimurium*, todos los sistemas PhoP/PhoQ analizados funcionalmente hasta el momento respondieron a variaciones en las concentraciones de Mg²⁺ extracelular y estuvieron involucrados en distintas vías de virulencia en patógenos bacterianos. En *P. aeruginosa*, una mutación en *phoQ* provoca una disminución en la citotoxicidad en células epiteliales humanas y una disminución en la sobrevivencia en infecciones pulmonares crónicas en ratas (115). Por otro lado, se ha demostrado la importancia de PhoP en la sobrevivencia de *Yersinia pestis* dentro de macrófagos (116).

Las cepas de *S. Typhimurium* que poseen deleciones en los genes *phoP* o *phoQ* muestran deficiencias en su virulencia: su dosis letal media en ratones BALB/c inoculados intraperitonealmente es cinco órdenes de magnitud mayor que la cepa salvaje, son incapaces de sobrevivir en macrófagos y presentan una susceptibilidad aumentada a péptidos microbicidas, sales biliares y pH ácido (10, 117, 118).

La mutante constitutiva denominada *pho24* induce una sobreexpresión de los genes activados por PhoP y una represión de los genes reprimidos por PhoP. Esta mutante posee un único cambio de nucleótido que resulta en una sustitución aminoacídica del residuo de treonina 48 por isoleucina, correspondiente al dominio periplásmico del sensor PhoQ (119, 120). Es interesante el hecho que la mutante constitutiva *pho24* exhibe varios fenotipos de virulencia descritos para la mutante nula *phoP*. Además, tiene disminuida su capacidad de invadir células no fagocíticas

debido a la represión de varios genes de la SPI-1 (121), y es deficiente en la inducción de la formación de vacuolas espaciales en macrófagos (122). Estos resultados indican que la simple activación de los genes activados por PhoP no es suficiente para la virulencia, sino que es necesaria una regulación espacial o temporal de su expresión.

4. a. Genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ

En *Salmonella*, el sistema PhoP/PhoQ controla la expresión de aproximadamente el 3 % de los marcos abiertos de lectura de su genoma (113, 114). Varios genes regulados por PhoP han sido identificados por métodos genéticos clásicos (99, 123), IVET (tecnología de expresión *in vivo*) (124), DFI (fluorescencia diferencial) (31) y análisis con MALDI-TOF (119). Recientemente, el uso de microarreglos de ADN ha permitido determinar que la expresión de más de 200 genes es dependiente de PhoP (92). En la Tabla INT.1 se resumen algunos de los genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ descritos hasta el presente, y de los cuales se conoce su función.

GEN	FUNCIÓN / PROPIEDADES	REF.
<i>phoPQ</i>	Sistema de dos componentes.	(125)
<i>mgtA</i>	Transportador de Mg ²⁺ tipo P.	(101)
<i>mgtCB</i>	Transportador de Mg ²⁺ tipo P.	(101)
<i>pmrAB</i>	Sistema de dos componentes que responde a Fe ³⁺ .	(126, 127)
<i>pmrC</i>	Fosfoetanolamina transferasa que incorpora fosfoetanolamina al lípido A del LPS.	(128)
<i>pmrD</i>	Activador del sistema PmrAB en condiciones de bajo Mg ²⁺ .	(129)
<i>ugd</i>	UDP-glucosa deshidrogenasa.	(103)
<i>pbpPE</i>	Síntesis e incorporación de 4-aminoarabinosa en el lípido A.	(103)
<i>pagP</i>	Enzima de membrana externa que media la transferencia de palmitato desde un fosfolípido al lípido A.	(130)
<i>pagC</i>	Proteína de membrana externa esencial para la sobrevivencia en macrófagos.	(131)
<i>pagD</i>	Proteína periplásmica de función desconocida.	(123, 131)
<i>lpxO</i>	Dioxigenasa dependiente de Fe ²⁺ /α-cetoglutarato que cataliza la hidroxilación del lípido A (PagQ).	(132)
<i>pagL</i>	Proteína de membrana externa que remueve el grupo R-3-hidroximiristato en la posición 3 de ciertos precursores del lípido A.	(133)
<i>pcgL</i>	Dipeptidasa periplásmica para la digestión de D-ala-D-ala en el peptidoglicano. Necesaria para la resistencia a vancomicina.	(134)
<i>phoN</i>	Fosfatasa ácida periplásmica no específica.	(120)
<i>mig-14</i>	Proteína de membrana interna, promueve la resistencia a péptidos	(135)

	microbicidas, la sobrevida en macrófagos y la infección persistente.	
<i>ais</i>	Proteína periplásmica inducible por aluminio (<i>pagH</i>).	(136)
<i>slyA</i>	Miembro de la familia MarR de reguladores transcripcionales requerido para virulencia y sobrevida en macrófagos.	(15)
<i>slyB</i>	Lipoproteína de membrana externa.	(99)
<i>pgtE</i>	Proteasa de membrana externa implicada en resistencia al péptido C18G	(137)
<i>spvB</i>	Mono (ADP-ribosil) transferasa codificada en el plásmido de virulencia.	(124)
<i>ssrAB</i>	Sistema de dos componentes codificado en SPI-2.	(138)
<i>hilA</i>	Regulador transcripcional de genes de invasión codificados en la SPI-1.	(121)
<i>prgHIJK</i>	Componentes del T3SS codificado en la SPI-1.	(121)
<i>rstAB</i>	Sistema de dos componentes.	(139)

TABLA INT.1. Genes regulados por el sistema de dos componentes *PhoP/PhoQ*

La identificación de los genes regulados por PhoP puede confundirse por el hecho de que muchos genes son indirectamente regulados por PhoP, mediante el control de otros sistemas regulatorios de dos componentes a nivel transcripcional, como *RstA/RstB* (140), post-transcripcional, como *SsrB/SpiR* (138), y post-traducciona, como *PmrA/PmrB* (141) (Figura INT.6).

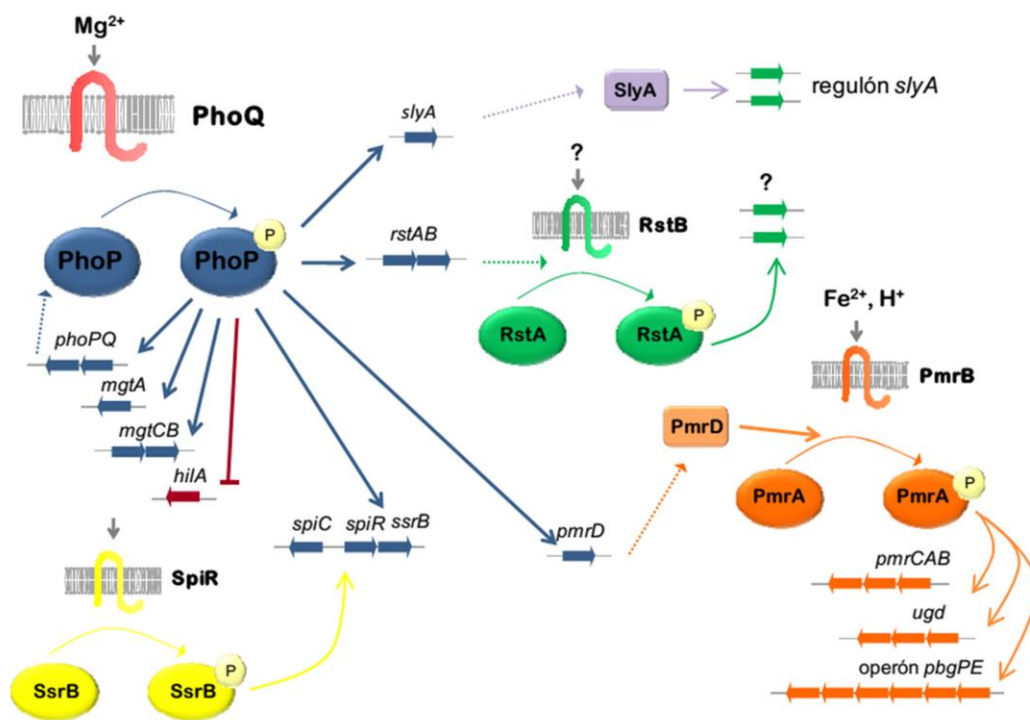


FIGURA INT.6: Regulón *PhoPQ*. Los genes directamente regulados por el sistema se representan en azul, los genes reprimidos en violeta, y los indirectamente regulados en otros colores.

El operón *phoPQ* se transcribe a partir de dos promotores, uno constitutivo y uno autorregulado. El promotor constitutivo mantiene niveles basales de expresión de las proteínas PhoP y PhoQ. Ante una activación del sistema por una disminución de la concentración de Mg^{2+} en el medio, se produce una retroalimentación positiva estimulándose la transcripción a partir del promotor auto-regulado, esto resulta en un mayor nivel de expresión tanto de PhoP como de PhoQ y una concomitante activación de los genes regulados por el sistema (125).

En *Salmonella*, el sistema PhoP/PhoQ controla la homeostasis del Mg^{2+} a través de la expresión de varios genes necesarios para el crecimiento en medios con bajos contenido Mg^{2+} , entre ellos *mgtA* y *mgtB*, que codifican para dos de los tres transportadores de Mg^{2+} presentes en *Salmonella* (101, 142). Al igual que la mutación en *phoP*, mutaciones en *mgtA* o *mgtB* producen un defecto en el crecimiento en condiciones de bajo Mg^{2+} extracelular, lo que sugiere que ambos transportadores son necesarios para mantener niveles fisiológicos de Mg^{2+} en el citoplasma de *Salmonella* (99).

El sistema PhoP/PhoQ regula directamente genes que confieren resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos, una amplia clase de antimicrobianos naturales encontrados por las bacterias en diversos medios. Entre ellos se encuentra el gen *pgtE*, que codifica una proteasa de la membrana externa que cliva catelicidinas (137) o *pagP*, que transfiere palmitato al lípido A, reduciendo la permeabilidad de la membrana externa e incrementando la viabilidad en presencia de péptidos microbicidas (104).

Otros genes activados por PhoP regulan el fagosoma a través de la regulación del T3SS codificado por SPI-2, y están involucrados en la respuesta de tolerancia ácida, que sería importante dentro del fagosoma (143).

El sistema PhoP/PhoQ también controla genes que alteran los procesos del hospedador, resultando en la divergencia de la vacuola que contiene a *Salmonella* desde la vía endocítica, induciendo la expresión de genes que codifican el invasoma y de efectores que median la entrada de la bacteria a células no fagocíticas así como también alteran la presentación de los antígenos de *Salmonella* (26, 144, 145).

Otro blanco de regulación del TCS es el sistema sensor quinasa PmrA/PmrB. En conjunto con el sistema PmrA/PmrB y RcsBCD, PhoP/PhoQ regula la expresión del gen *ydeI*, que codifica una proteína periplásmica importante para la resistencia a la polimixina B actuando con la porina OmpD en la membrana externa (146). Además, PhoP/PhoQ regula indirectamente un subgrupo de genes que están bajo el control del sistema de dos componentes PmrA/PmrB (127). PmrA es el regulador de la respuesta y PmrB la histidina quinasa sensora asociada que responde a concentraciones extracelulares de hierro (147). PmrA activa genes necesarios para modificar el LPS y disminuir la carga total negativa del lípido A, minimizando las interacciones electrostáticas con los péptidos catiónicos antimicrobianos (103, 126, 148).

Los genes reprimidos por PhoP incluyen los genes del T3SS de la SPI-1, como *hilA*, *prgH* e *invF*. Estos genes han sido identificados como reprimidos en la mutante constitutiva *pho24*, pero no se ha visto regulación de los mismos por Mg^{2+} , ni efecto en las mutantes nulas tanto en *phoP* como en *phoQ*, y tampoco se conocen las condiciones bajo las cuales PhoP podría reprimir estos genes.

Recientemente, Gottesman y cols. describieron en *E. coli* (pero existen evidencias de que también está presente en *Salmonella*), un sARN (ARN pequeño no-codificante) de 98 nt, designado MgrR (por ARN responsivo al Mg^{2+}) cuya expresión es dependiente del sistema PhoP/PhoQ. MgrR regula modificaciones en el LPS a través de la regulación negativa de *eptB*, un gen que codifica para una fosfoetanolamina transferasa que cataliza la incorporación de fosfoetanolamina al Kdo del LPS en condiciones de crecimiento de bajo Mg^{2+} (149, 150).

4. b. Estructura de la histidina quinasa PhoQ

La región periplásmica de PhoQ consiste en una región central de cinco láminas β , coincidente con la topología de los dominios PAS. Sin embargo, esta región está flanqueada por una larga hélice α N-terminal y varias hélices α cortas, formando un plegamiento característico que se ha denominado dominio PDC (por ser un plegamiento común encontrado en PhoQ-DcuS-CitA) (151). La unión de los cationes divalentes ocurre en un grupo de residuos ácidos, denominado parche ácido, que

están adyacentes a dos hélices α . En esta región acídica se identificaron tres sitios de unión a calcio (Ca^{2+}), pero podría haber más sitios de unión a metal (59).

Basándose en la orientación de los extremos N-terminal y C-terminal, se predijo que el parche acídico apuntaría a la membrana interna bacteriana, que al contener fosfolípidos cargados negativamente, haría que PhoQ experimente una repulsión de cargas, alejándose de la bicapa lipídica. Se determinó, además, que los iones Ca^{2+} funcionarían como puentes entre parches acídicos de dímeros de PhoQ adyacentes, siendo estos iones el nexo entre las cargas negativas de la proteína y de la membrana. Basándose en estos datos estructurales y bioquímicos, se propuso un modelo para la represión de PhoQ en el que, cuando los cationes divalentes están presentes, forman un puente que aliviaría la repulsión de cargas y anclaría a PhoQ en la membrana, manteniéndolo en una estructura más rígida correspondiente al estado reprimido. El desplazamiento del ión metálico por otro ligando, o por crecimiento en ausencia de cationes divalentes, resultaría en la desestabilización de los puentes entre la HQ y la bicapa lipídica, y en una repulsión de cargas que forzaría a las hélices α a alejarse de la membrana. Esto induciría un cambio estructural que podría actuar como una señal inductora transducida a través del dominio periplásmico, y eventualmente a través de la membrana o por la molécula entera, para iniciar la transducción de la señal (59).

4. c. Señales moduladoras de la actividad del sistema PhoP/ PhoQ

Catión divalente Mg^{2+} :

El sistema PhoP/PhoQ constituye el primer ejemplo de un sistema regulatorio que utiliza el Mg^{2+} extracelular como la señal primaria, actuando como el ligando específico de la proteína sensora PhoQ. Se ha demostrado que la unión de Mg^{2+} con el dominio periplásmico de PhoQ provoca un cambio en la conformación de la proteína, induciendo una actividad fosfatasa específica que controla el estado de fosforilación del regulador PhoP, modulando su actividad transcripcional, resultando en la represión de la transcripción de al menos 20 diferentes *loci* activados por PhoP (98, 101, 152, 153).

La interacción del Mg^{2+} con el dominio sensor de PhoQ es esencial para disparar su actividad fosfatasa. Se determinó que el residuo His conservado, clave en la reacción de autofosforilación, es requerido para que se observe la actividad fosfatasa. El crecimiento en concentraciones micromolares de Mg^{2+} , promueve la transcripción de los genes activados por PhoP de una manera PhoP- y PhoQ-dependiente, mientras que el crecimiento en concentraciones milimolares de Mg^{2+} reprime la expresión de los genes activados por PhoP a los niveles observados en las mutantes nulas para *phoP* o *phoQ* (99).

Además del Mg^{2+} , se demostró que los cationes divalentes Ca^{2+} y Mn^{2+} pueden reprimir la transcripción de los genes activados por PhoP (101). Experimentos *in vivo* indican que el sistema PhoP/PhoQ responde a los niveles periplásmicos de estos cationes divalentes a través de la unión directa de los mismos al dominio periplásmico de PhoQ. Se pudo establecer la existencia de sitios de unión diferentes e independientes para Mg^{2+} y Ca^{2+} , y se calcularon sus afinidades aparentes (101, 152). Experimentos *in vitro* demostraron que el dominio periplásmico purificado de PhoQ une Mg^{2+} , pero no Ba^{2+} , un catión divalente incapaz de reprimir la transcripción de los genes regulados por PhoP.

Se ha propuesto que la detección de los niveles de Mg^{2+} utilizando el sistema PhoP/PhoQ le permitiría a *Salmonella* determinar su localización subcelular (113). Una baja concentración de Mg^{2+} indicaría un ambiente intravacuolar (SCV), mientras que una alta concentración del catión indicaría una localización extracelular. En este sentido, se ha determinado que la concentración de Mg^{2+} en suero es de 0,7-1 mM (154) y ha sido estimada como menor a 50 μ M en fagosomas de células epiteliales conteniendo a *Salmonella* (155) o menor a 100 μ M en macrófagos conteniendo *Y. pestis* (156). Esta hipótesis es consistente con el patrón de expresión de los genes activados por PhoP, cuya transcripción se induce en bajas concentraciones de Mg^{2+} *in vitro* y dentro de los fagosomas acidificados en macrófagos (113, 117, 124), como también dentro de los tejidos de ratones en infecciones sistémicas (157).

Péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs):

Como se mencionó anteriormente, los CAMPs son un componente importante de la inmunidad innata de una variedad de organismos. Los mismos presentan una gran diversidad de secuencia, pero la mayoría comparte características comunes, incluyendo una carga neta positiva y una estructura anfipática, lo que promueve su capacidad de interactuar con membranas biológicas cargadas negativamente.

Los mecanismos desarrollados por las bacterias para resistir a la muerte por CAMPs han sido muy bien caracterizados en *S. Typhimurium*. Esta resistencia está adquirida por modificaciones en el Lípido A del LPS presente en la superficie celular (158). Las modificaciones del Lípido A en una gran variedad de bacterias Gram negativas está regulada por el sistema PhoP/PhoQ.

El sistema PhoP/PhoQ es activado *in vivo* dentro de los fagosomas acidificados en los macrófagos y es reprimido *in vitro* durante el crecimiento en altas concentraciones de los cationes divalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . Se ha propuesto que dentro de los fagosomas existe una condición de baja concentración de cationes divalentes, funcionando como señal para la activación de PhoQ. Sin embargo, esto es motivo de controversia ya que existen trabajos que muestran que la concentración de Mg^{2+} dentro del fagosoma se estabilizaría en 1 mM poco después de ingreso de *Salmonella* en el macrófago (159), lo que llevaría a pensar que puedan existir otros factores específicos dentro del fagosoma que lleven a la activación de PhoQ.

Bader y cols. demostraron que la exposición de *Salmonella* a concentraciones subinhibitorias de CAMPs activa PhoP/PhoQ en presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} (160). Utilizando la proteína PhoQ purificada, reconstituida en vesículas de membrana, se determinó que la activación de la expresión génica ocurre a través de la unión directa de los CAMPs al dominio periplásmico de PhoQ (140). Estos estudios demostraron que la exposición de PhoQ a los CAMPs provocó un aumento de los niveles de PhoP fosforilado, como así también un incremento de la activación de los genes dependientes de PhoP, aún en presencia de Mg^{2+} 1 mM. Sin embargo, en presencia de mayores concentraciones de Mg^{2+} , la activación por concentraciones micromolares de CAMPs puede competir con la del metal, indicando que los mismos se unirían al mismo sitio que el catión divalente, pero con mucha mayor afinidad. Como los CAMPs están cargados positivamente, podrían unirse al

parche ácido. Además, se identificaron dentro del parche ácido dos mutaciones, en residuos que participan en la unión del Ca^{2+} en la estructura cristalina de PhoQ, que muestran un defecto en la activación inducida por el péptido catiónico C18G (59).

Estos datos son consistentes con el modelo propuesto por Prost y cols., en el que los cationes divalentes unirían a PhoQ a la membrana interna, manteniéndolo en su estado reprimido, y que los CAMPs, con mayor afinidad por los sitios de unión a metal, anfipáticos y más grandes que los cationes divalentes, forzarían a una parte de la proteína a alejarse de la membrana, desplazando el metal. Para tener acceso y desplazar los iones metálicos del parche ácido, los CAMPs forzarían a las hélices α_4 y α_5 , alejándolas de la membrana. Se ha propuesto que este movimiento de hélices α sería el responsable del mecanismo estructural para el inicio de la activación por PhoQ (161).

pH:

Además de los CAMPs, el pH es también una señal activadora directa de PhoQ en presencia de una concentración de cationes divalentes de 1 mM. Dentro de los fagosomas, el pH varía desde 5,0 a 6,5 (117, 159). Cuando se neutraliza el pH fagosomal no hay activación de los genes dependientes de PhoP, indicando que el pH podría ser una señal *in vivo*.

En experimentos en los que PhoQ se reconstruyó inserto en vesículas de membrana, se demostró que el dominio periplásmico de PhoQ reconoce directamente el pH a una concentración de cationes divalentes de 1 mM (117, 162). En las vesículas de membrana, los efectos de los CAMPs y el pH fueron aditivos en cuanto a la fosforilación de PhoP, lo que sugiere distintos mecanismos de inicio del sensado y la activación para estas dos señales estimuladoras.

Un estudio por RMN de los cambios estructurales del dominio periplásmico de PhoQ en respuesta a la acidificación mostró que este dominio permaneció estable y plegado a pH 3,5. Se vio también que a pH 5,5 la proteína fue capaz de unir metal. El espectro observado a pH ácido fue único comparado con el espectro en ausencia de ligando, en presencia del catión divalente o de CAMPs, indicando que PhoQ es capaz de adoptar una conformación específica a bajo pH, aún en presencia de puentes del

metal intacto. Además, se identificó una mutación en un residuo His del dominio periplásmico de PhoQ (localizado en la lámina β , formando parte de una red de puentes hidrógeno que otorga rigidez estructural al núcleo de la proteína), cuyo espectro de RMN a pH neutro se asemejaba al observado en el espectro de la proteína salvaje a bajo pH (59).

Estos datos son consistentes con un modelo en el que la acidificación induce una pérdida de rigidez estructural en el núcleo de la proteína, que también puede ser mimetizada con mutaciones en residuos que mantienen esta rigidez. Se postula que esta rigidez es esencial en el estado reprimido, para compensar la repulsión electrostática remanente no neutralizada por los puentes de metal. La pérdida de rigidez otorgaría mayor flexibilidad a las hélices α_4 y α_5 para poder alejarse de la membrana, activando la proteína de manera semejante a los CAMPs, forzando estéricamente a las mismas hélices a moverse. Varios de los residuos en la red de interacción de la His-157 están muy cerca de la región C-terminal del dominio periplásmico, que luego continúa en la membrana. Por lo tanto, cambios en esta región podrían iniciar la señalización transmembrana al causar un movimiento del C-terminal periplásmico. Este movimiento podría alterar entonces la orientación de las regiones que abarcan la membrana y acercar los dominios citoplásmicos para favorecer la fosforilación de la histidina dentro del dímero (162).

INT. 5. Los TCS como blanco terapéutico para agentes antimicrobianos en bacterias patógenas

Los TCS presentan características que los hacen atractivos como un blanco potencial para el desarrollo de novedosos agentes antibacterianos: 1) existe homología entre las HQ y los RR de diferentes géneros de bacterias, particularmente en los aminoácidos cercanos al sitio activo; 2) las bacterias patógenas utilizan la transducción por TCS para regular la expresión de factores de virulencia esenciales requeridos para la sobrevivencia dentro del hospedador; 3) las bacterias contienen gran cantidad de TCS, algunos de ellos esenciales para su viabilidad; 4) la transducción de señales en mamíferos ocurre por un mecanismo diferente.

Los antibióticos convencionales usualmente se dirigen directamente a las proteínas que llevan a cabo funciones esenciales, mientras que los que inhiben específicamente los TCS se dirigen a un nivel previo de control de las funciones regulatorias (163). Las HQ tienen gran interés médico debido a que están involucradas en múltiples aspectos de la regulación bacteriana y su ubicuidad en bacterias las hace un objetivo ideal para el desarrollo de nuevas clases de drogas antimicrobianas. Esta forma de antibióticos indirectos es extremadamente importante en un tiempo donde existe un aumento en la aparición de bacterias resistentes o multiresistentes.

Mediante un rastreo de bibliotecas de compuestos sintetizados químicamente, se han identificado diferentes clases de inhibidores de TCS. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos compuestos no son selectivos para las vías de transducción, y ejercen su efecto por múltiples mecanismos de acción (164).

Los inhibidores más comunes son compuestos hidrofóbicos que inhiben la actividad autoquinasa de las HQ de forma no competitiva con respecto al ATP. Estos compuestos generalmente ejercen su efecto por unión al ovillo de cuatro hélices que contiene los residuos His conservados, provocando una alteración estructural que lleva a la agregación de la HQ, resultando en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima (165). Sin embargo, esta clase de inhibidores usualmente previene el crecimiento bacteriano por mecanismos independientes de la inhibición de las HQ.

La búsqueda de inhibidores competitivos de las HQ presenta un considerable desafío en cuanto a la especificidad. No son muchos los inhibidores competitivos respecto al ATP reportados hasta el momento. Se han descrito varias clases de inhibidores de HQ efectivos, pero desafortunadamente muchos tienen poca biodisponibilidad debido a sus propiedades altamente hidrofóbicas (166). El medio ambiente del dominio HQ es hidrofóbico en sí mismo, lo que favorecería la interacción con estas moléculas. Algunos otros inhibidores han mostrado baja selectividad y muestran otros mecanismos de inhibición aparte de la inhibición de las HQ, como la agregación de proteínas (167).

Un ejemplo es el análogo no hidrolizable del ATP, AMP-PNP, que inhibe las HQ por unión irreversible al sitio activo sin provocar agregación, sin embargo no es un candidato para ser utilizado como fármaco (164, 165, 168).

Como ha sido mencionado anteriormente, las HQ no se encuentran en mamíferos. Sin embargo, el inusual dominio de unión al ATP de las HQ es compartido con varias proteínas como la chaperona Hsp90 y ciertas quinasas mitocondriales (68). Gilmour y cols. identificaron una nueva clase de inhibidores competitivos del ATP en la autofosforilación de la HQ, el 3,6-diamino-5-ciano-4-fenil-tienopiridina-2-carboxílico (TEP). TEP actuó como un inhibidor competitivo de las HQ sin causar agregación de proteínas y sin afectar las Ser/Tre quinasas humanas comunes. TEP presenta una estructura cíclica que lo asemeja a las purinas, pero las bases estructurales de la inhibición todavía no fueron determinadas. Desafortunadamente, la hidrofobicidad de TEP provocó su partición en las membranas celulares y no mostró actividad *in vivo* (169).

Por otra parte, se identificaron mediante análisis *in silico*, una serie de inhibidores de la HQ YycG de *Staphylococcus epidermidis*, componente del sistema de dos componentes YycG/YycF que se cree está involucrado en la regulación de la pared celular. Se encontraron siete compuestos activos contra diferentes especies de *Staphylococcus*, que no mostraron citotoxicidad en células eucariotas, cuatro de los cuales se unen a YycG e inhiben la autofosforilación de la enzima (170).

Estudios recientes sugieren que las librerías de productos naturales deben ser testeadas para posibles inhibidores de HQ. Por ejemplo, se ha descrito que valkmicina C (VKM C) producida por *Streptomyces* sp. inhibe tres HQ de *Streptococcus mutans* purificadas, y que esta represión se traslada a HQ al nivel de célula entera. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para el crecimiento de 22 cepas de Gram(+) ensayadas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, fueron de 0,063 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para VKM C. Cuando el compuesto fue utilizado a concentraciones sub-inhedoras, las bacterias formaron biopelículas anormales y mostraron defectos en la competencia. Además, cuando las células fueron pre-tratadas con VKM C se observó una sensibilidad a acidez incrementada (171).

Existen escasos ejemplos en la literatura de compuestos que inhiban específicamente una HQ en particular. Guarnieri y cols. demostraron la interacción inhibitoria del compuesto radicicol (un conocido inhibidor de la familia de proteínas GHKL que incluyen GyrB, Hsp90 y MutL) con la HQ PhoQ. Mediante un análisis de la estructura cristalina del dominio catalítico de PhoQ (PhoQ_{cat}) solo y PhoQ_{cat} con

radicicol, se determinó que el compuesto se une a residuos dentro del bolsillo de unión a ATP, a través de varios puentes hidrógeno e interacciones covalentes con residuos localizados cerca de las cajas conservadas N, G1, G2 y G3. Se determinó también que el radicicol inhibió la actividad autoquinasa de la región citoplasmática de PhoQ, mientras que otros inhibidores de la familia GHKL como novobiocina o geldamicina no lo hicieron. La comparación entre la unión de radicicol a la proteína Hsp90 y PhoQ_{cat} mostró que el mismo se una con diferente orientación y afinidad al bolsillo de unión a ATP, lo que constituye una característica atractiva al momento de desarrollar compuestos inhibidores específicos de sensores quinasa (172).

Un estudio reciente reportó cuatro compuestos como potenciales inhibidores de PhoQ de *Shigella flexneri*. Estos compuestos inhibieron la actividad de autofosforilación de la porción intracelular de PhoQ (PhoQ_C), y también presentaron altas afinidades de unión a la proteína PhoQ_C. Se observó que tres de estos compuestos inhibieron la invasión de células HeLa con *S. flexneri* 9380. Además, ratones inoculados con *S. flexneri* pre-tratada con los compuestos no mostraron inflamación, mientras que ratones inoculados con la cepa sin tratar evidenciaron inflamación severa. Más aún, los cuatro potenciales inhibidores de PhoQ no mostraron citotoxicidad o actividad hemolíticas significativa (173).

INT. 6. Extractos vegetales como fuente de agentes antibacterianos

El interés en los productos naturales (originados en animales, microbios o plantas) como paliativos o curativos de una variedad de dolencias se remonta al principio de la historia del mundo. Existen evidencias que los Neandertales hace 60000 años utilizaban algunas hierbas para fines medicinales. Egipcios, griegos, chinos e hindúes han documentado el uso de diferentes sustancias y formulaciones, la mayoría de las cuales eran basadas en plantas. Hipócrates, cinco siglos a.C., ya hacía mención de 300 a 400 plantas medicinales. En el año 65 d.C., el botánico griego Dioscorides produjo el trabajo titulado “De Materia Medica”, un catálogo medicinal de unas 600 plantas, el cual es todavía un documento muy reconocido en el uso de hierbas en medicina y que fue el prototipo para las farmacopeas modernas. Los pueblos nativos americanos utilizaban gran número de plantas para prácticas curativas. Pero no fue sino hasta el año 1800 cuando se aislaron por primera vez una

serie de compuestos activos puros a partir de fuentes naturales, como por ejemplo la estricnina, la morfina o la colchicina, dando comienzo a la era moderna de la industria farmacológica (174).

La naturaleza ha evolucionado durante miles de años una diversa biblioteca de compuestos químicos, estéricamente más complejos y con una mayor diversidad de estructuras cíclicas comparados con los compuestos sintéticos y los que pueden desarrollarse por química combinatoria. Debido a esto, los productos naturales han dejado ver vías para nuevos enfoques terapéuticos, han contribuido al entendimiento de numerosas vías bioquímicas y han sido invaluable como plataformas para el desarrollo de nuevas drogas. La urgente necesidad de creación de nuevas drogas requeridas en distintas áreas terapéuticas promueve el desarrollo de nuevas estrategias para el aprovechamiento de la gran diversidad química de los productos naturales. Estas estrategias abarcan la exploración de fuentes no convencionales de compuestos naturales (175), el desarrollo de metodologías para la síntesis de bibliotecas de productos naturales (176, 177) y la generación de compuestos bioactivos a través de la diversificación química de productos naturales inactivos (178–180).

La ineficacia observada últimamente en el uso de antibióticos tradicionales (productos de microorganismos o sus derivados sintéticos), junto con la aparición de nuevas enfermedades, que permanecen intratables con este tipo de drogas, ha provocado que la medicina se haya volcado a la investigación en el uso de productos naturales derivados de plantas como antibacterianos, entre otras actividades terapéuticas (181).

INT. 7. Compuestos naturales como inhibidores del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*

Como se ha descrito, el sistema regulatorio PhoP/PhoQ tiene un rol fundamental en la capacidad adaptativa de *S. Typhimurium* frente a los desafíos ambientales dentro y fuera del hospedador, siendo central para la virulencia de este microorganismo. El hecho de que los TCS se encuentren solo en procariotas, eucariotas inferiores y plantas, hace que PhoP/PhoQ sea un blanco ideal para el

desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas tendientes a la búsqueda de nuevos compuestos que prevengan o controlen la patogénesis de *Salmonella* en el hospedador mamífero. Por su parte, los extractos vegetales son fuente de compuestos con una diversidad química excepcional, que constantemente dan origen a nuevos agentes terapéuticos (182, 183).

Durante el trabajo de tesis doctoral de la Dra. Mariela Sciara (184), se comenzó con la búsqueda e identificación de extractos de especies de plantas regionales que regulasen la actividad del TCS PhoP/PhoQ. Para analizar los posibles efectos de los extractos naturales sobre este TCS, se utilizó la metodología denominada bioautografía, que combina una cromatografía en capa delgada (*Thin Layer Chromatography*, TLC) con la determinación de actividad *in situ* a partir de la expresión de un gen reportero regulado por el sistema PhoP/PhoQ (185–187). Entonces, en presencia de un extracto que contenga compuesto(s) represor(es) del sistema PhoP/PhoQ no habrá expresión del gen reportero, por lo que existirá una zona incolora pero con turbidez, producto del crecimiento bacteriano. En cambio, si el compuesto fuera bactericida, existirá una zona incolora translúcida, sin crecimiento bacteriano.

Este procedimiento permitió identificar diversos extractos vegetales con actividad inhibitoria sobre la expresión del gen reportero PhoP-regulado *virK*, siendo el extracto derivado de la especie *Lamium amplexicaule* el que mostró mayor halo inhibitorio. Posteriormente, se logró establecer que las especies presentes en el extracto que eran responsables del efecto observado sobre el TCS PhoP/PhoQ eran los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFAs), principalmente ácido linoleico.

Este resultado fue verificado utilizando LCUFAs puros de origen comercial, demostrando que los mismos reprimían específicamente la actividad del sistema PhoP/PhoQ cuando eran agregados exógenamente al medio de cultivo bacteriano. Por su parte, también se verificó que los ácidos grasos de igual longitud de cadena carbonada no ejercían efecto alguno sobre la expresión del gen reportero regulado por PhoP, y que ninguno de los ácidos grasos ensayados mostró efecto sobre la expresión de genes regulados por otro TCS homólogo. Más aún, los LCUFAs inhiben

específicamente la actividad del TCS PhoP/PhoQ por disminución de la expresión, a nivel transcripcional, tanto del operon *phoPQ* como de genes activados por PhoP.

Estos antecedentes dieron origen al desarrollo del presente trabajo de tesis, para determinar el mecanismo de acción de los LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Resulta de particular interés establecer el blanco de acción específico de los mismos sobre los distintos pasos del mecanismo de transducción de señales, es decir, si estos compuestos actúan a nivel de la actividad bifuncional quinasa/fosfatasa de la proteína sensora PhoQ, o sobre la interacción entre PhoQ y el regulador de respuesta PhoP, o sobre las propiedades transcripcionales de PhoP.

INT. 8. Ácidos grasos

Químicamente, un ácido graso (AG) es un ácido carboxílico con una cola alifática (cadena), y aquellos encontrados con más frecuencia en la naturaleza poseen una cadena con número par de átomos de carbono (C), desde 4 a 28. En base a esta diferencia de longitud de cadena carbonada, se los puede clasificar en: ácidos grasos de cadena corta (menos de 6 átomos de C, SCFA), de cadena mediana (entre 6 y 12 átomos de C, MCFA), de cadena larga (entre 13 y 21 átomos de C, LCFA), o de cadena muy larga (cuando poseen más de 22 átomos de C, VLCFA). Los AG generalmente derivan de triglicéridos o fosfolípidos, y cuando no están unidos a otras moléculas se los conoce como ácidos grasos “libres”.

Por otra parte, la cadena puede ser saturada (si no posee dobles enlaces carbono-carbono) o insaturada (en caso de presentar uno o más dobles enlaces). Los dos átomos de C que en la cadena están unidos por el doble enlace pueden encontrarse en configuración *cis* o *trans*. Una configuración *cis* es aquella en la cual los dos átomos de hidrógeno (H) adyacentes al doble enlace se proyectan hacia el mismo lado de la cadena. Esto hace que el doble enlace se rigidice, que la cadena se curve y que la libertad conformacional del ácido graso se vea restringida. A mayor cantidad de dobles enlaces, menor es la flexibilidad de la molécula. El efecto de esto es que, en ambientes restringidos (como cuando los AG forman parte de un fosfolípido en una bicapa lipídica o de triglicéridos en gotas de lípidos), los enlaces *cis* limitan la habilidad de los AG de ser empacados estrechamente, y por lo tanto afectan la

temperatura de fusión de la membrana o de la grasa. En contraste, en la configuración *trans* los átomos de H adyacentes al doble enlace se encuentran en lados opuestos de la cadena. Como resultado, no provocan mucha curvatura de la cadena, y su forma es similar a la de los AG saturados. La mayoría de los AG encontrados naturalmente son de configuración *cis*, mientras que aquellos de configuración *trans* no se encuentran en la naturaleza y son resultado del procesamiento humano (por ejemplo, hidrogenación). Sin embargo, también es posible hallar en la naturaleza ácidos grasos que presenten ambas configuraciones, como por ejemplo los AG denominados “conjugados del ácido linoleico” (*conjugated linoleic acids*, CLA).

Las diferencias de geometría entre los distintos tipos de AG insaturados, así como también entre AG saturados e insaturados, tiene un rol fundamental en los procesos biológicos y en la construcción de estructuras biológicas (como las membranas celulares). En todos los organismos, los ácidos grasos son componentes esenciales de las bicapas lipídicas (sintetizados para la incorporación en los fosfolípidos de membrana), y son importantes como moléculas señalizadoras y como fuentes de carbono y de energía metabólica cuando se asocian al ciclo del ácido cítrico a través de la vía de β -oxidación.

8. a. Metabolismo bacteriano de los ácidos grasos

Los ácidos grasos ingresan a la célula y son oxidados completamente por la vía de β -oxidación, generando acetyl-CoA como producto final (Figura INT.7). Si bien la mayoría de lo que se conoce del metabolismo de los ácidos grasos deriva de estudios realizados en *E. coli* (188, 189), se ha demostrado que en *S. Typhimurium* el mecanismo es semejante (189).

Los genes que codifican para las enzimas de la vía de β -oxidación se agrupan en el regulón *fad* (*fatty acid degradation*), y están distribuidos en distintos lugares del cromosoma, siendo *fadAB* el único operón conocido. El regulón *fad* es el responsable del transporte, activación y β -oxidación de los ácidos grasos de cadena mediana (C_6 - C_{12}) y larga ($>C_{12}$). Su expresión es estrictamente controlada por el represor transcripcional FadR.

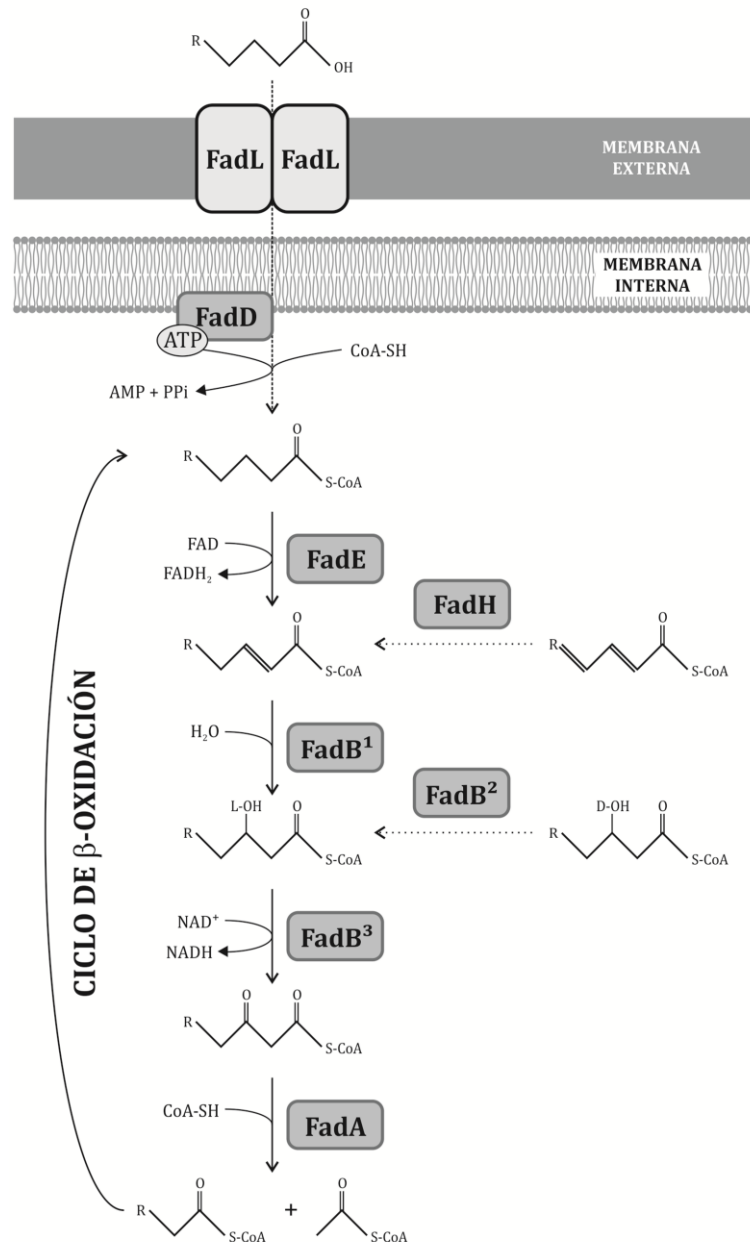


FIGURA INT.7: Esquema de la vía de β -oxidación de ácidos grasos. En cada ciclo de β -oxidación, el acil-CoA pierde un fragmento de dos carbonos como acetil-CoA y reduce 1 mol de FAD y 1 mol de NAD. El acetil-CoA es luego metabolizado y la molécula de acil-CoA acortada vuelve a entrar al ciclo de degradación sin necesidad de activación. Se indican las enzimas que catalizan cada paso: FadL, transportador de ácidos grasos de cadena larga (C_{12} - C_{18}); FadD, acil-CoA sintetasa; FadE, acil-CoA deshidrogenasa; FadH, acil-CoA reductasa; FadB¹, enil-CoA hidratasa; FadB², 3-hidroxiacil-CoA epimerasa; FadB³, 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa; FadA, 3-cetoacil-CoA tiolasa.

En los estadios iniciales de este proceso, se requieren los productos de los genes *fadL* y *fadD* para el transporte e incorporación de los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) exógenos a través de las membranas celulares hacia el citosol (Figura INT.7).

El gen *fadL* codifica para una proteína transportadora de LCFA. FadL se localiza en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y cepas mutantes en esta proteína son incapaces de crecer en LCFA como única fuente de carbono y energía (190). La captación de AG está acoplada a la formación del acil-CoA correspondiente, dado que muy bajos niveles de AG libres son encontrados en las células.

El gen *fadD* codifica para la enzima acil-CoA sintetasa, que juega un rol central en el transporte de los ácidos grasos, mediando la activación del ácido graso catalizando la formación del acil-CoA (190). El mecanismo propuesto comenzaría con la unión de ATP a la proteína FadD, lo cual provoca el movimiento de la misma hacia la cara interna de la membrana interna bacteriana. Una vez que FadD entra en contacto con la membrana, esta enzima extrae los AG concomitantemente con la formación del acil-AMP respectivo y la liberación de pirofosfato (PPi). Luego, la enzima une coenzima A (CoA) con la liberación de AMP y la formación del acil-CoA, el que a su vez es liberado de la enzima. Este proceso hace que el transporte de ácidos grasos sea unidireccional (191, 192).

El primer paso en el ciclo de β -oxidación involucra la conversión del acil-CoA a enoil-CoA a través de la enzima acil-CoA deshidrogenasa codificada por el gen *fadE* (193). El resto de los pasos en la degradación de los ácidos grasos es llevado a cabo por un complejo tetramérico consistente en dos subunidades FadB y dos subunidades FadA, codificado por el gen *fadAB*. Este complejo posee cinco actividades enzimáticas diferentes incluyendo funciones de hidratación, oxidación y clivaje tiolítico a través de las enzimas 3-cetoacil-CoA tiolasa, enoil-CoA hidratasa, L-3-hidroacil-CoA deshidrogenasa, cis- Δ^3 -trans- Δ^2 -enoil-CoA isomerasa y 3-hidroxiacil-CoA epimerasa (194) (Figura INT.7).

La vía de β -oxidación actúa de manera cíclica, en la que cada ciclo resulta en el acortamiento en dos átomos de carbono del acil-CoA inicial para generar acetil-CoA, intermediario metabólico clave, que podrá ser utilizado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o en el ciclo del glioxilato. La molécula de acil-CoA acortada vuelve a entrar al ciclo de degradación sin necesidad de activación (194).

El control transcripcional de los genes involucrados en la degradación aeróbica de ácidos grasos ocurre mediante la proteína reguladora FadR. Bajo

condiciones normales de crecimiento, tanto FadL como FadD se encuentra en bajos niveles dentro de la célula y las concentraciones intracelulares de acil-CoA son bajas, lo que permite que FadR se una a los operadores de los genes *fad* de la degradación de AG (actuando como represor) o de los genes *fab* de la biosíntesis de AG (actuando como activador). Cuando las células encuentran LCFA en el medioambiente, estos ligandos se unen a FadL, inducen un cambio de conformación por ligando dentro de la proteína, y son transportados al espacio periplásmico. El ambiente más ácido del periplasma promueve la formación de moléculas de AG no cargadas, las cuales se particionan en la membrana y la atraviesan. Entonces, la proteína FadD extrae estos AG desde la membrana y lo acopla a su activación. A medida que los niveles de LCFA-CoA se incrementan dentro de las células, estas moléculas se unen a FadR causando un reordenamiento conformacional significativo del dominio de unión a ADN, lo que atenúa la represión transcripcional de los genes *fad*, y desreprime la activación transcripcional de los genes *fab* (191, 195, 196).

8. b. Los ácidos grasos en la fisiología animal

Los ácidos grasos forman parte de diversos fluidos fisiológicos, como suero y bilis. Un trabajo reciente, ha caracterizado el metaboloma de suero humano mediante la combinación de métodos de resonancia magnética nuclear (NMR), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) y cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS) con la búsqueda bibliográfica asistida por computadora, para identificar y cuantificar los metabolitos comúnmente encontrados en suero humano (197). Las tablas conteniendo la lista completa de los 4229 compuestos presentes en suero, su concentración, las referencias a literatura relacionada y enlaces a sus asociaciones conocidas con enfermedades se encuentran disponibles en <http://www.serummetabolome.ca>. En este estudio, se determinó mediante análisis por GC-MS que la concentración de los ácidos grasos insaturados palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) es de $9,66 \pm 6,8 \mu\text{M}$; de $122 \pm 56 \mu\text{M}$; y de $83,8 \pm 38 \mu\text{M}$ en suero humano, respectivamente. Sin embargo, al determinar las concentraciones de los mismos mediante TLC/GC-FID se encontró que las mismas eran de $6,39 \pm 4,28 \mu\text{M}$; de $49,24 \pm 19,31 \mu\text{M}$; y de $14,73 \pm 4,33 \mu\text{M}$ para los ácidos grasos C16:1, C18:1 y C18:2, respectivamente. Esta discrepancia es debida a que las muestras analizadas

proviene de individuos distintos, por lo que las variaciones observadas son atribuibles a la diferencia en la dieta, salud y estado nutricional de los individuos.

Además, los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFA) pueden encontrarse en el contenido ruminal y en el intestino de mamíferos debido a la degradación de nutrientes que los contengan por parte de enzimas lipolíticas o por acción de los microorganismos que forman parte de la flora intestinal normal. En los seres humanos el ácido linoleico (*cis-9,cis-12-18:2*) es metabolizado a conjugados del ácido linoleico (CLA) (principalmente *cis-9,trans-11-18:2*), por acción de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal (p.e. *Bifidobacterium*) (198–201). Éstos son luego convertidos a ácido vaccénico (VA) (*trans-11-18:1*) y luego a ácido esteárico (C18:0) (198). Los humanos también producimos ciertos isómeros de CLA a partir de isómeros *trans* de ácido oleico, como el ácido vaccénico, el cual es convertido a CLA en los tejidos por la delta-9-desaturasa (201, 202).

Finalmente, los LCUFA se encuentran presentes en el tracto digestivo, formando parte de los componentes de la bilis. La bilis es una mezcla compleja que incluye colesterol, fosfolípidos, sales inorgánicas y ácidos grasos saturados e insaturados, y que es secretada al lumen intestinal desde la vesícula biliar. Existen escasos reportes respecto a la concentración de ácidos grasos en bilis humana. Un estudio realizado por Hori y cols., mediante el análisis de 11 muestras de bilis por HPLC, estableció que la concentración total de ácidos grasos libres fue de $0,61 \pm 0,41$ mM, y que existían diferencias notorias entre individuos. En estas muestras, el contenido porcentual de los LCUFA C16:1, C18:1 y C18:2 fue de $2,58 \pm 1,95$ %; de $15,20 \pm 5,18$ %; y de $26,05 \pm 10,49$ %, respectivamente (203).

El rol de la bilis en la fisiología intestinal es el de emulsificar los lípidos y proteger al hospedador de las bacterias debido al efecto detergente de sus ácidos biliares anfipáticos. Sin embargo, las bacterias patógenas han evolucionado para sobrevivir en presencia de la bilis, y muchas se han adaptado para reconocerla como una señal indicativa de su ubicación dentro del hospedador y para poder responder mediante la inducción de factores de virulencia para facilitar su supervivencia (204).

8. c. Bilis, ácidos grasos y virulencia

Cuando *Salmonella* ingresa al hospedador se expone a distintos tipos de estrés a los que debe responder para sobrevivir. En el intestino, los múltiples factores externos a los que está expuesta incluyen: la acción de la bilis secretada al duodeno desde la vesícula biliar sobre las membranas externa e interna, la disminución gradual de la concentración de oxígeno o la presencia de otros microorganismos componentes de la flora microbiana normal que depletan el intestino de nutrientes y liberan productos metabólicos secundarios como propionato o butirato (205).

Salmonella Typhimurium puede adaptarse a crecer en extremadamente altas concentraciones de bilis mediante la exposición a dosis subletales, y este fenotipo es dependiente de la fase de crecimiento y de la concentración de bilis (206).

En cuanto a los mecanismos de resistencia, en bacterias Gram(-) la membrana externa es una excelente barrera hidrofóbica frente a la bilis. Sin embargo, las formas no cargadas y lipofílicas de las sales biliares pueden ingresar a la célula directamente atravesando la membrana externa o a través de porinas como OmpF. Los ácidos biliares que logran ingresar a la células todavía pueden ser removidos por las bombas de eflujo antes de que exista un daño significativo (204).

Se ha demostrado en *Salmonella* la importancia del LPS como una barrera de defensa primaria contra la acción antimicrobiana de la bilis (207). Además, se ha descrito en *E. coli* que los sistemas de eflujo AcrAB-TolC y EmrAB-TolC son necesarios para la resistencia de esta bacteria frente a solventes, detergentes, colorantes y sales biliares; y estos sistemas de eflujo también se han identificado en *S. Typhimurium* y *Vibrio cholerae*, entre otros (204). Recientemente, se ha descubierto en *E. coli* que el transportador de resistencia a múltiples drogas MdtM participa en la resistencia a sales biliares mediante el transporte activo de estas especies fuera del citoplasma celular. Además, se ha demostrado que este transportador simple un colato y deoxicolato, y que actúa en forma sinérgica con el sistema tripartito AcrAB-TolC para generar un efecto multiplicador en la resistencia (208).

La bilis afecta la expresión de proteínas de *Salmonella*, muchas de las cuales son miembros del regulón *phoPQ*. Una mutante en este TCS que provoca la expresión constitutiva del regulón mostro elevada resistencia a bilis, mientras que una mutante

nula *phoP* es cinco veces menos resistente a este fluido. Sin embargo, esta resistencia no es debida al sentido de bilis por parte de PhoP/PhoQ (204).

Se ha determinado que la bilis sirve como señal para suprimir la maquinaria de invasión de *Salmonella*. Se observó que la invasión a células epiteliales *in vitro* estaba disminuida en presencia de bilis, y que este efecto es debido a la supresión de la expresión de genes de la SPI-1 mientras *Salmonella* permanezca localizada en el lumen intestinal. Sin embargo, luego del pasaje a través de la capa mucosa y la llegada a la superficie de las células epiteliales, la concentración aparente de bilis decrece y la maquinaria de invasión es activada (209).

Por otra parte, existen antecedentes que vinculan el metabolismo de los ácidos grasos con fenotipos de virulencia. Los genes involucrados en el ingreso y degradación de ácidos grasos serían importantes en varias etapas de la infección por *S. Typhimurium* y muchos de estos genes estarían inducidos *in vivo*. Por ejemplo, en un rastreo de genes inducidos *in vivo*, se aisló una fusión a *fadL* del intestino de un ratón infectado 24 horas después de la inoculación gástrica con *S. Typhimurium* (210). Además, se ha mostrado que una mutante incapaz de metabolizar ácidos grasos exhibe una virulencia reducida después de la inoculación oral en ratones (211). También, se ha observado inducción de la expresión del gen *fadF*, requerido para el metabolismo de ácidos grasos de cadena mediana y larga, en células epiteliales en cultivo (212). Más aún, se determinó que una mutante *fadD* disminuyó la expresión de *hilA*, el regulador transcripcional de la SPI-1 que modula la expresión de genes de invasión, de una manera independiente de FadR, de FliZ y de HilE (213, 214).

El trabajo de Lesley y cols. mostró que el sistema PhoP/PhoQ de *E. coli* puede reprimirse por acetato extracelular de manera PhoQ-dependiente, pero sin involucrar interacciones entre el acetato y el dominio periplásmico de PhoQ. En vez de esto, la represión ocurre a través de la perturbación del recambio de acetil-CoA intracelular. Se mostró que el acetil-CoA actuaría como un inhibidor no competitivo de la reacción de autoquinasa de PhoQ *in vitro*. Se planteó un modelo en el cual el acetato extracelular reprime la señalización modificando la concentración intracelular de acetil-CoA, el cual inhibe la autofosforilación de la histidin quinasa PhoQ (215).

Estos resultados sugieren que *S. Typhimurium* podría monitorear la variación de la disponibilidad de ácidos grasos o de sus efectos en el nivel nutricional, composición de membrana o niveles de intermediarios de la vía degradativa, en las distintas etapas de la infección.

En conjunto, una combinación de múltiples mecanismos regulatorios asegura que la invasión este limitada a un sitio y tiempo específico durante la infección. Cuando *Salmonella* está presente en el lumen intestinal, varios factores ambientales como osmolaridad, pH, cationes, bilis y metabolitos de la flora bacteriana, coordinadamente con el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, regulan la expresión de los genes esenciales para la invasión (141).

זמנ

OBJETIVOS

נעם

Objetivos generales:

El presente trabajo de tesis se enmarca en un proyecto que tiene como objetivo la identificación y caracterización funcional de compuestos presentes en extractos vegetales naturales y modificados químicamente que presenten actividad moduladora sobre el sistema de transducción de señales PhoP/PhoQ. En este sentido, ha sido determinado que los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFAs) son inhibidores específicos de la actividad del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.

Objetivos particulares:

Para este trabajo de tesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar el blanco de acción específico de LCUFAs sobre el mecanismo de transducción de señales del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.
- Analizar la relación entre el efecto inhibitorio observado y la vía de β -oxidación de ácidos grasos.
- Estudiar el efecto de fluidos fisiológicos y de la combinación de ácidos grasos insaturados sobre la expresión de genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ.
- Analizar el perfil de expresión génica de cepas de *Salmonella* crecidas en presencia de LCUFAs mediante ensayos de microarreglos, para identificar posibles nuevos blancos de acción de estos compuestos.

Π Π Ο Π Π

MATERIALES Y MÉTODOS

Π Π Π Π Π

M&M. 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos empleados se detallan en las tablas M&M.1, M&M.2 y M&M.3, respectivamente.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma, se disolvieron en agua destilada estéril hasta una concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para las reacciones de PCR se realizaron diluciones de los cebadores hasta una concentración de 5 μM .

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Salmonella typhimurium</i>		
MS14028s	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ATCC
PB9646	7065 pKD46	Stock de laboratorio
MS7953s	14028s <i>phoP</i> ::Tn10	(10)
PB1209	14028s <i>phoQ</i> ::Tn10 <i>virK</i> ::MudJ	Stock de laboratorio
PB10357	14028s Δ <i>fadD</i> <i>phoQ</i> ::Tn10 <i>virK</i> ::MudJ	Este trabajo
PB2790	14028s <i>virK</i> ::MudJ	Stock de laboratorio
PB3062	14028s <i>tppB</i> ::MudJ	Stock de laboratorio
PB7983	14028s Δ <i>fadAB</i> <i>virK</i> ::MudJ	(216)
PB8264	14028s Δ <i>fadAB</i> <i>tppB</i> ::MudI	(216)
PB8099	14028s Δ <i>fadD</i>	(216)
PB8280	14028s Δ <i>fadD</i> <i>virK</i> ::MudJ	(216)
PB8049	14028s Δ <i>fadD</i> <i>tppB</i> ::MudI	(216)
PB8575	14028s Δ <i>fadL</i>	(216)
PB8601	14028s Δ <i>fadL</i> <i>virK</i> ::MudJ	(216)
PB10453	14028s Δ <i>fadL</i> <i>tppB</i> ::MudI	(216)
PB11045	14028s <i>speB</i> ::3xFLAG	Este trabajo
PB11047	14028s <i>astE</i> ::3xFLAG	Este trabajo
PB11051	14028s <i>STM14_4905</i> ::3xFLAG	Este trabajo
PB11865	14028s <i>ast</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11867	14028s <i>lsr</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11871	14028s <i>speB</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11865	14028s <i>phoP</i> ::Tn10 <i>ast</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11867	14028s <i>phoP</i> ::Tn10 <i>lsr</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11871	14028s <i>phoP</i> ::Tn10 <i>speB</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
PB11850	14028s <i>phoQ</i> ::Tn10 Δ <i>mgrB</i>	Este trabajo
PB11851	14028s <i>phoQ</i> ::Tn10 Δ <i>dsbA</i>	Este trabajo
PB11764	14028s <i>phoQ</i> ::Tn10 <i>pagL</i> :: <i>TnphoA</i>	Este trabajo
PB11766	14028s <i>phoQ</i> ::Tn10 <i>pagP</i> :: <i>TnphoA</i>	Este trabajo

PB11768	14028s Δ <i>fadD phoQ</i> ::Tn10 <i>pagL</i> :: <i>TnphoA</i>	Este trabajo
PB11770	14028s Δ <i>fadD phoQ</i> ::Tn10 <i>pagP</i> :: <i>TnphoA</i>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
M15/pREP4	<i>F</i> -, Φ 80 Δ <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> -, <i>mtl</i> -, <i>recA</i> +, <i>Km</i> ^R	(217)

Tabla M&M.1. *Cepas bacterianas*

PLASMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pUHE21-2<i>laqI</i>^a	rep _{pMB1} Amp ^r <i>lacI</i> ^a	(125)
pEnvZ	rep _{pMB1} Amp ^r <i>lacI</i> ^a <i>envZ</i>	Stock de laboratorio
pPhoQ	rep _{pMB1} Amp ^r <i>lacI</i> ^a <i>phoQ</i>	(218)
pPhoQ_a	rep _{pMB1} Amp ^r <i>lacI</i> ^a <i>phoQ_a</i>	Stock de laboratorio
pPhoQ_b	rep _{pMB1} Amp ^r <i>lacI</i> ^a <i>phoQ_b</i>	Stock de laboratorio
pQE31::<i>phoQ</i>	ColE1 Amp ^r <i>phoQ</i>	Stock de laboratorio
pQE31::<i>ZhoQ</i>	ColE1 Amp ^r <i>ZhoQ</i>	Stock de laboratorio
pKD46	<i>bla</i> pBAD <i>gam bet exo</i> pSC101 oriTS	(219)
pJB20	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT <i>lacZY</i> ⁺ PS1 PS2 oriR6K	(220)

Tabla M&M.2. *Plásmidos*

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')
ast-P1 Fwd	CATATAAATAACTTTTATTTTTTACCAAAAGAGGTCGCTgtgtaggctggagctgcttcg
ast-P2 Rev	CATCAGCGCGGCGATATCCGCATGTTTCGACAGGACGAAcatatgaatatcctcctta
ast-prom Fwd	CAGAACGGGGCGGTAATTTTC
lsr-P1 Fwd	CACGTTGCGTTTTGGCGAACATGGTTCGTCGGAGGCAACggtgtaggctggagctgcttcg
lsr-P2 Rev	CAGCGCAATTTCCCAGCTATAGCGTCGCCATGGATTCAcatatgaatatcctcctta
lsr-prom Fwd	ACCACCGCGCGTTAAATATC
speB-P1 Fwd	GGGTTTTTTTTATATTGACTAAGAAGAGGTTTTTGGCCgtgtaggctggagctgcttcg
speB-P2 Rev	GTAGGCCGGATAAGCGCAGCGCCATCCGGCAAAACAACcatatgaatatcctcctta
speB-prom Fwd	CTGTGCTATTACTGGACGGC
P1REV	CGAAGCAGCTCCAGCCTACAC
LacZREV	ATCAAGCTTCGACGGCCAGTGAATC

Tabla M&M.3. *Oligonucleótidos*

M&M. 2. Medios de cultivo y antibióticos

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano fueron el medio Luria-Bertani (LB): peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l (Difco LB Broth); y el medio mínimo N: KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7,5 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Tris-HCl 0,1 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 μM, glicerol 38 mM.

Para preparar medios sólidos se agregó agar en concentración final de 15 g/l. Para preparar medios semisólidos (soft agar) se agregó agar en concentración final de 6 g/l.

Los antibióticos empleados fueron: ampicilina (Amp) (100 µg/ml), cloramfenicol (Cm) (20 µg/ml), kanamicina (Km) (50 µg/ml), tetraciclina (Tc) (15 µg/ml), espectinomycin (Sp) (100 µg/ml) según corresponda en cada caso.

M&M. 3. Reactivos

El [γ - ^{32}P]ATP (3000 µCi/mmol) y el [1 - ^{14}C]ácido linoleico (58,2 mCi/mmol) fueron obtenidos de PerkinElmer Life Sciences. Todos los ácidos grasos (99% pureza) fueron adquiridos en Sigma: ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 Δ^9), esteárico (18:0), oleico (18:1 Δ^9), linoleico (18:2 Δ^6), y γ -linolénico (18:3 Δ^6). La pureza de los ácidos grasos insaturados fue chequeada mediante análisis por ^1H RMN. Los espectros de ^1H RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker Avance II a 300 MHz en CDCl_3 (7,26 ppm), en presencia de TMS (0.00 ppm) como estándar interno. La ausencia de Mg^{2+} en los stocks de ácidos grasos fue verificada mediante espectrometría de absorción atómica.

Los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) fueron diluidos en tergitol 10% a una concentración final de 50 mg/ml, mientras que los ácidos grasos insaturados (palmitoleico, oleico, linoleico, y linolenico) fueron diluidos en etanol absoluto a una concentración final de 100 mg/ml. La concentración micelar crítica (CMC) para las sales sódicas de los ácidos grasos oleico, esteárico, palmítico y linoleico ha sido calculada en el rango de 1,8-3,5 mM (221, 222). Aunque los valores exactos de CMC bajo nuestras condiciones experimentales no han sido determinados, a partir de estos datos orientativos las concentraciones utilizadas en nuestros ensayos se encuentran por debajo de las respectivas CMC (0,5 mg/ml corresponde a concentraciones $\leq 1,8$ mM para los ácidos grasos utilizados).

Las muestras de bilis fisiológica fresca fueron obtenidas a partir de ratas macho Wistar, cedidas gentilmente por el grupo de la Dra. Cristina Carnovale del Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), e inmediatamente alicuotadas y conservadas a 4, -20 y -80°C.

M&M. 4. Preparación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se preparó a partir de células de *E. coli* JM109 previamente transformadas. Las células fueron crecidas en 3 ml de medio LB, con el agregado del antibiótico adecuado, a 37°C con agitación constante hasta la saturación del cultivo. Las células se recolectaron por centrifugación, y la GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

M&M. 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo: solución de amplificación comercial suplementada con MgCl₂ 2,5 mM, cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato 0,8 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Invitrogen), 1 µg de ADN molde (cantidad variable), 5 pmol de oligonucleótido directo y reverso, y 1,25 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen). Para la amplificación se siguió un protocolo básico consistente en una desnaturalización inicial a 94°C de 3 min, luego 35 ciclos formados por 30 segundos de desnaturalización a 94°C, un anillado de 30 segundos entre 50-60°C (según las características de los oligonucleótidos), y una elongación a 72°C, cuyo tiempo dependió de la longitud del fragmento a amplificar (1 min por cada 1 kpb). Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla M&M.3. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa como se indica en la sección M&M.7.

M&M. 6. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)

La reacción se llevo a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo: solución de amplificación comercial suplementada con MgCl₂ 2,5 mM, cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato 0,8 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Invitrogen), 5 pmol de oligonucleótido directo y reverso, 1,25 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen) y una colonia bacteriana disuelta en esta mezcla de reacción. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla M&M.3. Esta técnica se utilizó para la búsqueda de la presencia de distintos fragmentos de interés en las cepas transformadas. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa como se indica en la sección M&M.7.

M&M. 7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN plasmídico y los productos obtenidos en las PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración según el tamaño esperado del fragmento a analizar. Se utilizó el sistema de tipo submarino (223). La solución reguladora TBE 0,5x (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA) se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de los geles. Para la visualización de los fragmentos a estos últimos se les agregó el agente intercalante bromuro de etidio en una concentración de 0,3 µg/ml antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025 % (p/v) azul de bromofenol, 0,025 % (p/v) xilencianol y 30 % (v/v) glicerol, en una proporción 5:1 en volumen de muestra:solución de siembra. La corrida electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA y, una vez finalizada, los fragmentos de ADN se detectaron mediante un transiluminador de luz UV (Electronic UV Transilluminator Ultra·Lum, Inc.), estimando el tamaño de los fragmentos analizados con los marcadores de peso molecular 1 Kb DNA Ladder o 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) según corresponda.

Para registrar las imágenes de los geles se utilizó una equipo capturador de imágenes Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad).

M&M. 8. Transformación bacteriana con ADN plasmídico

8. a. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *S. Typhimurium* 14028s, las mismas se crecieron en medio LB con agitación constante a 37°C hasta saturación del cultivo. Se diluyeron 2 ml de este cultivo en 200 ml de LB fresco y se crecieron en un erlenmeyer de 500 ml con agitación constante a 37°C hasta una DO a 630 nm (DO₆₃₀) de 0,6-0,7. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó 5 min a 7000 rpm a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó tres veces con 40 ml de glicerol estéril 10% (p/v). Finalmente, se resuspendió en 400 µl de glicerol estéril 10% (p/v) y se alicuotó en tubos estériles, que se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Para la preparación de células competentes de *Salmonella* 7065/pKD46, las mismas se crecieron en medio LB suplementado con Amp en agitación constante a 30°C hasta saturación del cultivo. Se diluyo 1 ml de este cultivo en 100 ml de LB

suplementado con Amp y se creció en un erlenmeyer de 300 ml con agitación constante a 30°C por 1 h más. Se indujo la expresión del sistema de recombinación λ Red a partir del plásmido pKD46 mediante el agregado de arabinosa hasta una concentración final de 20 mM. Se creció en las mismas condiciones hasta una DO_{630} de 0,6. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó 5 min a 7000 rpm a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó tres veces con 40 ml de glicerol estéril 10% (p/v). Finalmente, se resuspendió en 200 μ l de glicerol estéril 10% (p/v) y se alicuotó en tubos estériles, que se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

8. b. Transformación y selección

Para transformar las células competentes se colocaron 40 μ l de la suspensión de las mismas en una celda de electroporación de 0,2 cm de espacio entre electrodos (Bio-Rad), se agregaron 1-3 μ l del plásmido o 10 μ l del producto de PCR, y se electroporó utilizando un voltaje de 2,5 kV con un electroporador Bio-Rad. Luego se agregó 1 ml de medio LB, y se incubó 1 h con agitación constante a 37°C (para el caso de las cepas de *S. Typhimurium* 14028s) o a 30°C (para el caso de las cepas de *S. Typhimurium* 7065). Para el caso de éstas últimas, luego de transcurrida la hora de incubación a 30°C, las mismas fueron colocadas en agitación constante durante 3 hs mas a 37°C. Las células fueron concentradas por centrifugación y sembradas en su totalidad usando espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las células transformantes, y se incubaron a 37°C durante una noche.

M&M. 9. Transducción mediante el bacteriófago P22.

Las mutantes en los diferentes genes de *Salmonella*, fueron movilizadas mediante transducción generalizada con fago P22.

9. a. Obtención de lisados de la cepa dadora

Para realizar el lisado de la cepa dadora, se tomaron 100 μ l de un cultivo en LB saturado de la cepa dadora y se lo incubó con 100 μ l de una dilución 10^{-4} de la suspensión de fagos P22 HT crecidos en la cepa 14028s. Luego se agregaron 3 ml de medio LB semisólido fundido a 42°C, se agitó vigorosamente y se distribuyó la mezcla

sobre placas de Petri con medio de cultivo LB sólido. Las placas fueron incubadas 5-7 horas a 37°C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro.

Para recolectar el lisado se agregó a la placa 5 ml de medio LB líquido y, con ayuda de una espátula de Drigalski, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200 µl de cloroformo para completar la lisis celular y se la centrifugó 10 min a 7000 rpm. El sobrenadante obtenido, conteniendo la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4°C hasta el momento de su uso.

9. b. Transducción generalizada

Una alícuota de 100 µl de un cultivo saturado de la cepa receptora se incubó durante 1 h a 37°C sin agitación con 50-100 µl de un lisado de fago P22 proveniente de la cepa dadora (224). Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril, según corresponda. La selección de transductantes se realizó sembrando el volumen de reacción de transducción en placas de Petri con medio LB sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente para su selección y EGTA 1,7 mM.

M&M. 10. Construcción de fusiones transcripcionales a *lacZ*

Para la construcción de las cepas 14028s *ast::lacZ*, *lsr::lacZ* y *speB::lacZY* se siguió la metodología descrita por Beaber y cols. (220). El protocolo consiste en utilizar la técnica para introducir mutaciones en el genoma de la bacteria descrita por Datsenko y cols. (219). Este método se basa en la recombinación homóloga catalizada por proteínas del fago λ Red, luego de la transformación de las células con ADN lineal.

El fragmento de ADN lineal se obtuvo mediante la amplificación por PCR de un casete de resistencia a cloramfenicol (Cm^R), flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (FRT), ubicado corriente abajo de la secuencia codificante (sin promotor) para el gen de la enzima β-galactosidasa (*lacZ*). Los oligonucleótidos utilizados para esta amplificación son diseñados con extremos 5' homólogos a las regiones flanqueando la zona donde se desea insertar la fusión transcripcional (H1 y H2) y extremos 3' que hibridan en el plásmido molde pJB20 (P1 y P2) (Figura M&M.1). Los pares de oligonucleótidos utilizados para generar los

fragmentos de ADN lineal por PCR fueron: ast-P1 Fwd / ast-P2 Rev, lsr-P1 Fwd / lsr-P2 Rev, y speB-P1 Fwd / speB-P2 Rev.

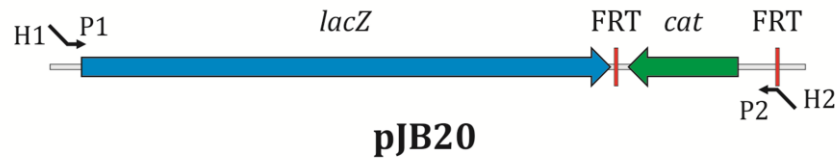


FIGURA M&M.1: Esquema de un fragmento del plásmido pJB20. Se indican las regiones codificantes para el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*), para la resistencia a cloranfenicol (*cat*), los sitios de recombinación de la recombinasa flp (FRT), y los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de ADN lineal. P1 y P2 indican las regiones de los oligonucleótidos con homología con el plásmido, mientras que H1 y H2 se refiere a las regiones homólogas flanqueando la zona donde se desea insertar la construcción en el genoma de la bacteria.

Con estos fragmentos se transformaron células de *Salmonella* 7065/pKD46 electrocompetentes. El plásmido pKD46 es termosensible, y presenta los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, cuyos productos génicos evitan la degradación del ADN lineal por la nucleasa RecBCD de la bacteria y facilitan la recombinación de este con el cromosoma.

La electroporación se realizó con 10 μ l de producto de PCR concentrado (20x) y desalado. Previo a la selección, se incubó 1 hora a 30°C y luego 3 horas a 37°C con agitación en LB. La presencia de la mutación deseada en los transformantes fue confirmada por PCR a partir de colonia. Finalmente, la mutación obtenida fue transferida a la cepa salvaje 14028s mediante transducción con el bacteriófago P22 (224). Para la preparación de lisados de las cepas de *Salmonella* 7065 se agregó al LB agar semisólido, 0,2% glucosa y 0,1% galactosa y se siguió el protocolo descrito en la sección M&M.9.a.

M&M. 11. Medida de actividad β -galactosidasa

Para la medida de actividad β -galactosidasa de cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales al gen *lacZ*, se utilizó una modificación del protocolo propuesto por Miller (225).

En los ensayos en tubo, las células a ser analizadas fueron crecidas en 1 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes, y con o sin el agregado de 10 mM MgCl₂ y/o de los ácidos grasos puros comerciales y/o de bilis fisiológica, a las concentraciones indicadas. Para el caso de las cepas portando plásmidos, se agregó

IPTG a una concentración final de 0,7 mM. Las células fueron incubadas a 37°C con agitación constante hasta fase estacionaria. A una alícuota de 200 µl de estos cultivos se le midió la densidad celular por determinación de DO₆₃₀ previo a la medición de la actividad, en el lector de microplacas Biotek ELx808. Cuando las medidas fueron realizadas en otras fases de crecimiento, por ejemplo MEP (fase exponencial media) o ESP (fase estacionaria temprana), el cultivo en estado estacionario fue utilizado para realizar un inóculo 1/100 en medio de crecimiento LB, y estas células fueron incubadas el tiempo requerido en agitación a 37°C.

Para la determinación de la actividad se utilizaron 30 µl de cultivo proveniente de tubo, el cual fue agregado a un medio de reacción que contenía 275 µl de solución reguladora Z (Na₂HPO₄·7H₂O 16,1 g/l; NaH₂PO₄·H₂O 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,246 g/l; β-mercaptoetanol 0,27% (v/v)), 25 µl de cloroformo y 14 µl de SDS 0,1%. La reacción se llevó a cabo en un baño de H₂O a 30°C, y se inició por el agregado de 60 µl del reactivo ONPG 4 mg/ml a cada tubo, con posterior agitación vigorosa. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 150 µl de Na₂CO₃ 1M al observarse el desarrollo de color amarillo. Se registró el tiempo de reacción y se determinó la DO₄₀₅, utilizando un lector de microplacas Biotek ELx808. Cada reacción se procesó por duplicado y como blanco de reacción se utilizó un tubo con 30 µl de medio LB en lugar de cultivo. La actividad enzimática se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (Unidades Miller)} = [(DO_{405-1} + DO_{405-2}) / (2 \times DO_{630} \times \Delta t)] \times 10000$$

Donde DO₄₀₅₋₁ y DO₄₀₅₋₂ son cada una de las medidas de absorbancia a 405 nm de una muestra, obtenidas al analizarla por duplicado, Δt es el tiempo de reacción en min, y DO₆₃₀ la medida de absorbancia a 630 nm del cultivo líquido.

M&M. 12. Curvas de crecimiento bacteriano

Cultivos en fase estacionaria de cepas de *S. Typhimurium* salvaje, *fadL*, *fadD*, o *phoPQ* fueron diluidos 1/100 en una microplaca estéril de 96 pocillos (Greiner Bio-one) con medio LB fresco solo o con el agregado de los ácidos grasos comerciales, y la densidad óptica a 600 nm fue medida cada 60 min en un lector de microplacas BioTek Synergy 2 multimode. Las muestras fueron procesadas por duplicado, y los respectivos controles fueron realizados en cada microplaca.

M&M. 13. Fraccionamiento celular

13. a. Fraccionamiento para el análisis de la expresión de proteínas

Para el análisis de la expresión de proteínas, las cepas 14028s y 14028s *phoP* conteniendo las fusiones cromosomales *astE::3xFLAG*, *speB::3xFLAG* y *STM14_4905::3xFLAG* se crecieron en 2 ml de medio LB, con agitación a 37°C, hasta fase estacionaria. Al día siguiente, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Las bacterias fueron sonicadas y los lisados celulares fueron centrifugados 5 min a 6500 rpm para remover las células enteras. Los sobrenadantes se recuperaron y se conservaron a -20°C hasta su uso. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

Las muestras para la separación electroforética se prepararon por agregado de buffer de muestra 5X, y se ajustaron los volúmenes sembrados en el PAGE-SDS de modo de estandarizar las DO de los cultivos de partida. Luego, la detección del *tag* 3xFLAG se realizó por Western blot con anticuerpos policlonales anti-FLAG o anti-MBP como se describe en las secciones M&M.16 y 17.

13. b. Preparación de membranas citoplasmáticas

Las cepas de *S. typhimurium* conteniendo los vectores pUHE21-2::*phoQ*, pUHE21-2::*envZ*, pUHE21-2::*phoQ_a*, pQE31::*phoQ* y pQE31::*ZhoQ* fueron utilizadas para la obtención de membranas enriquecidas en PhoQ (o sus variantes truncadas) o EnvZ. Además, la cepa portando el vector pUHE21-2::*phoQ_b* fue utilizada para obtener fracciones solubles conteniendo la proteína respectiva, llevando a cabo una versión acotada del mismo protocolo, que se describe a continuación.

Un cultivo saturado de las distintas cepas fue diluido $1/100$ en 30 ml de medio LB fresco conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y el ácido graso comercial correspondiente en la concentración indicada en cada experimento. Estas fueron incubadas a 37°C con agitación constante hasta una DO_{630} 0,5. Luego se agregó IPTG 0,7 mM y se incubó 3 hs adicionales a 37°C con agitación constante. Las bacterias recolectadas fueron lavadas una vez con Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y resuspendidas en una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), sacarosa 20% (P/V), EDTA 5 mM y lisozima 150 µg/ml (Sigma). Esta suspensión se incubó 40 min a 4°C, se agregó 20 mM $MgCl_2$ y las células fueron centrifugadas por 20 min a 10000 rpm. El sedimento fue

resuspendido en Tris-HCl 10 mM y sonificado 3 veces con pulsos de 7 seg durante 35 seg. Los lisados celulares fueron centrifugados 5 min a 6500 rpm para remover las células enteras. Los sobrenadantes se centrifugaron 40 min a 15000 rpm, resultando en una fracción sobrenadante conteniendo proteínas citoplasmáticas (por ejemplo la versión truncada PhoQ_b) y una de pellet correspondiente a la fracción de membranas. Las membranas fueron lavadas con Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), luego con KCl 2 M y resuspendidas en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM. Finalmente, las membranas fueron lavadas con Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y resuspendidas a concentración final de 400 mg/ml en una solución con Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y KCl 50 mM. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo a 4°C.

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinónico (BioRad), usando albumina sérica bovina como estándar como se describe en la sección M&M.15.

La detección de las proteínas se determinó utilizando 5 µg de PhoQ (o sus variantes) o 20 µg de EnvZ de cada fracción en una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida y un posterior análisis por Western blot con anticuerpos policlonales anti-PhoQ o anti-EnvZ como se describe en las secciones M&M.16 y 17.

M&M. 14. Purificación de proteínas recombinantes

Para la obtención de proteína recombinante, se trabajó con una cepa de *Escherichia coli* que sobreexpresa la proteína PhoQ de *S. Typhimurium* unida a un *tag* de histidinas, a modo de facilitar su posterior purificación de otras proteínas presentes en el extracto celular.

Brevemente, un cultivo saturado de la cepa correspondiente fue diluido $1/100$ en 30 ml de medio LB fresco conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y ácido linoleico a concentración final 0,5 mg/mL o etanol en igual proporción (el solubilizante de este ácido graso). Las mismas fueron incubadas a 37°C con agitación constante hasta una DO₆₃₀ 0,5, y la inducción de la proteína recombinante fue realizada por agregado de IPTG a concentración final 0,7 mM. Luego de 3 horas de inducción a 37°C en agitación, se llevó a cabo la preparación de membrana interna por técnicas de fraccionamiento celular (sección M&M.13.b).

Para la recuperación de la proteína sensora PhoQ o sus variantes en forma soluble, se realizó la solubilización de las preparaciones de membrana interna mediante el tratamiento con detergentes. El tratamiento consistió en resuspender las preparaciones de membrana interna en buffer Tris 25 mM, NaCl 250 mM, Triton 1% (v/v) y dejar incubando durante 60' en hielo. Luego de transcurrido el tiempo, la fracción soluble (S1) e insoluble se separaron por centrifugación durante 40' a 15000 rpm, y la fracción insoluble fue resuspendida nuevamente en el mismo volumen de buffer (P1) e incubada en hielo durante otros 60', tiempo luego del cual se vuelve a centrifugar para recuperar una segunda fracción soluble (S2) y un pellet que es nuevamente resuspendido en el mismo volumen (P2). El control del tratamiento de solubilización se realiza mediante separación electroforética de cada una de las fracciones y posterior Western-blot utilizando los anticuerpos específicos contra PhoQ (secciones M&M.16 y 17). En base al resultado del análisis por Western-blot se decide si continuar trabajando con las fracciones solubles S1 y S2 por separado o juntarlas.

Para comenzar con el proceso de purificación se diluyó la fracción a utilizar con el mismo volumen de buffer Tris 25 mM NaCl 250 mM pero sin presencia de Triton (de manera de obtener una concentración final de detergente de 0,5% v/v), y esta muestra se utilizó para el subsiguiente paso de purificación. Luego de diversas pruebas para optimizar la purificación de la proteína sensora, finalmente se logró establecer un protocolo por el cual las mismas se obtuvieron con un grado de pureza que permitiera su escisión de los geles de poliacrilamida para la realización de estudios de espectrometría de masa (LC-MS). El protocolo consiste en la utilización de 500 ul de resina Ni-NTA agarosa (Qiagen), colocados en el cuerpo de una jeringa sin émbolo con la boquilla orientada hacia abajo, de manera de lograr un flujo de líquido con presión atmosférica. El buffer de base utilizado para la purificación es Tris 25 mM, NaCl 250 mM, Triton 0,5% (v/v), referido a partir de ahora como TNT.

En primer lugar, la resina fue equilibrada pasando 20 volúmenes del buffer de purificación. Luego, la muestra se hizo circular a través de la resina durante 7 a 10 ciclos, de manera de asegurar la unión de la mayor cantidad posible de proteína recombinante. El volumen obtenido luego de estos pasajes fue rotulado y guardado (*flowthrough*, FT). A continuación, la resina fue lavada con 10 volúmenes del buffer TNT, y las fracciones recolectadas (L1, L2, L3). Posteriormente, se procedió a la elusión de la proteína recombinante con un gradiente continuo de imidazol, desde 0 a

500 mM en buffer TNT, utilizando un dispositivo generador de gradiente. Se colectaron 20 fracciones de 500 μ l aproximadamente (E1 a E20), lo que corresponde a un cambio de gradiente de 25 mM imidazol entre cada fracción. Por último, para asegurar la liberación de todas las proteínas presentes en la resina, se pasaron 5 ml de buffer TNT Imidazol 500 mM y se recolectaron (fracción E21).

Una porción de las fracciones obtenidas es separada mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida 12%, para su posterior revelado mediante tinción con Coomassie o por Western-blot con anticuerpos policlonales anti-PhoQ, como se describe en las secciones M&M.16 y 17.

M&M. 15. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico (Sigma) según especificación del fabricante. Brevemente, se agregaron 200 μ l de reactivo conteniendo CuSO_4 y solución de ácido bicinonínico en una proporción 1:50 en volumen, a 50 μ l de muestra, y se incubó a 37°C. A los 10 min se midió la $\text{DO}_{562\text{nm}}$ en un lector de microplacas Biotek ELx808. Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina (BSA), realizándose una curva estándar la que se utilizó para determinar la concentración de cada muestra.

M&M. 16. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes y reductoras (PAGE-SDS)

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (226) Antes de la siembra, las muestras se calentaron 7 minutos 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 0,0012% (p/v). Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución reguladora Tris base 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) y SDS 0,1% (p/v), a una intensidad de corriente constante de 25 mA. La concentración de poliacrilamida utilizada en los geles de separación fue de 12-15% (p/v). Luego de la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectaron, como se detalla en la sección M&M.17, o se tiñeron en una solución de azul brillante de Coomassie R250 0,25% (p/v), isopropanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)

durante 2 horas, y se destiñeron en una solución de etanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante 1 h.

M&M. 17. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (“Western blot”)

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en una cuba de transferencia semi-seca (Trans-blot SD, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo con una solución conteniendo Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) y metanol 10% (v/v); durante 30 minutos con una intensidad constante de 300 mA. Una vez terminada la transferencia la membrana fue bloqueada con una solución TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM (pH 7,6)), conteniendo 5% (p/v) de leche en polvo descremada durante 60 minutos con agitación. Luego se incubó la membrana durante 1 h en agitación con los anticuerpos primarios respectivos, todos ellos disueltos en TBS: anticuerpos policlonales de conejo anti-PhoQ_{cit} o anti-EnvZ_{cit} (contra las porciones citoplásmicas respectivas de cada proteína, obtenidos previamente en nuestro laboratorio) en una dilución 1/100; anticuerpos anti-FLAG diluidos 1/300; o anticuerpos anti-His en una dilución 1/2000. Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h en agitación con: proteína A conjugada con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) disuelta 1/2000 en TBS, para el caso de la incubación con anti-PhoQ_{cit}, anti-EnvZ_{cit} o anti-His; o con anticuerpos ECLTM anti-mouse IgG conjugados con la enzima peroxidasa del rábano picante (HRP, GE Healthcare) disuelto 1/2000 en TBS, para el caso de la incubación con anti-FLAG. A continuación, se realizaron 3 lavados con TBS. Finalmente, se procedió al revelado de las muestras. Para ello, en el caso de haber utilizado anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina, se colocó la membrana en una solución Tris-HCl 100 mM pH 9,0 y MgCl₂ 0,5 mM a la cual se le agregó BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) 0,15 mg/ml y NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma) 0,3 mg/ml disuelto en 70% N-N-dimetilformamida, y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta desarrollo de color. En cambio, si como anticuerpos secundario fueron utilizados aquellos conjugados a HRP, el revelado se realizó mediante el kit de quimioluminiscencia Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

M&M. 18. Reacción de autoquinasa de PhoQ o EnvZ

La reacción de autofosforilación se llevó a cabo incubando membranas (50 μg de proteína total) conteniendo la proteína PhoQ o EnvZ en un volumen final de 30 μl de una solución TK (Tris-HCl 25 mM (pH 8), KCl 50 mM), conteniendo MgCl_2 1 mM, 50 μM ATP no marcado y 0,16 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. En los casos indicados, se agregó la concentración requerida de ácido linoleico en el medio de reacción. Las reacciones se comenzaron con el agregado de la fracción de membranas, se incubaron 10 min a 37°C, y se cortaron con el agregado de 6 μl de solución de siembra 5X (Tris-HCl 600 mM (pH 6,8), β -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,006%).

La cantidad de PhoQ o EnvZ marcada radioactivamente incrementó proporcionalmente a la cantidad de proteína de membrana en el rango de 0,16 a 2,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, indicando que PhoQ o EnvZ no se encuentran en exceso a 1,67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la concentración de membranas utilizadas en el ensayo de autofosforilación.

Las muestras fueron calentadas 3 min a 65°C. Una alícuota de las muestras se analizó mediante geles de poliacrilamida desnaturalizantes (12% acrilamida), luego transferidos a membranas de nitrocelulosa y finalmente sujetas a inmunodetección por Western-blot o análisis autoradiográfico por exposición a una película de rayos X (Kodak) en un cartucho de exposición con pantalla intensificadora.

Las membranas autoradiográficas y de Western-blot fueron analizadas densitométricamente usando el software ImageJ (227) para realizar determinaciones cuantitativas.

M&M. 19. Análisis de lípidos mediante cromatografía en capa delgada (TLC)

Cultivos en fase estacionaria de las cepas de *S. Typhimurium* salvaje, *fadL*, y *fadD* fueron diluidos $1/100$ en medio LB fresco conteniendo ácido linoleico comercial a una concentración final de 0,5 mg/ml y 0.075 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ácido linoleico. Las células fueron crecidas a 37°C durante 5 h en agitación. Luego, las mismas fueron recolectadas por centrifugación a 3000 X *g* por 10 min, lavadas tres veces con PBS (pH 7,4), y resuspendidas en 200 μl del mismo buffer. Los lípidos fueron extraídos por el método de Bligh and Dyer (228) durante un fin de semana, y sembrados sobre una placa de TLC silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Los lípidos fueron separados usando un

sistema de solventes consistiendo en dietil éter/éter de petróleo/ácido acético (70:30:2, v/v/v), que permite la separación de los ácidos grasos libres (que migran con el frente de corrida) de los ácidos grasos esterificados (que quedan retenidos en el punto de siembre). Las placas de TLC fueron expuestas durante toda la noche a una pantalla Storage Phospho Screener, y la señal fue detectada y analizada utilizando el sistema Amersham Biosciences Storm Imaging System equipado con Storm Scanner Control. Los lípidos totales fueron revelados con CuSO_4 10% en H_3PO_4 8%. La densitometría fue calculada para los puntos mayoritarios observados en la TLC.

M&M. 20. Ensayos de transcriptómica con “microarrays”

20. a. Extracción de ARN

Se inocularon con 3 colonias diferentes (réplica biológica), tanto para la cepa salvaje como para *phoP*, 3 tubos con 1 ml medio de crecimiento LB. Los cultivos se crecieron toda la noche en agitación a 37°C y, al día siguiente, cada uno fue utilizado para inocular a dilución final $1/100$ dos tubos de medio LB con agregado de ácido linoleico (concentración final 0,5 mg/ml) o etanol en igual proporción. Luego de que los mismos llegaron a fase estacionaria por crecimiento a 37°C en agitación, se realizó un pool de los 3 cultivos de la misma cepa en la misma condición, y se obtuvo el ARN siguiendo un protocolo estándar de extracción con Trizol.

El protocolo de extracción comienza con la preparación de tubos eppendorf conteniendo un volumen (200 μl) de la solución *stop* 5X (95% etanol, 5% fenol) en hielo. Inmediatamente luego de hacer el pool de los 3 cultivos de la misma cepa en la misma condición, se agregaron 4 volúmenes (800 μl) de cada pool a los tubos eppendorf conteniendo la solución *stop*, se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se colectaron las células por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet celular fue resuspendido en 100 μl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) conteniendo lisozima 1 mg/ml e incubado durante 5 min. Luego, a 50 μl de esta solución se le adicionó 1 ml de TRizol, se incubó nuevamente 5 min, se agregaron 200 μl de cloroformo, y después de incubar 2-3 min las muestras se centrifugaron durante 15 min a 14000 rpm. La fase acuosa superior fue trasvasada a otro tubo y se repitió 3 veces más la extracción con cloroformo, conservando siempre la fase acuosa. Posteriormente, se agregaron 500 μl de isopropanol, se incubó entre

10-120 min y se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 min. Por último, se agregó 1 ml de etanol 75% y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Se descartó el volumen por inversión y se repitió el agregado de etanol nuevamente. Las muestras se dejaron secar al aire para eliminar cualquier posible residuo de etanol. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente mientras que los pasos de centrifugación se realizaron a 4°C. Finalmente se resuspendieron las muestras en 30 µl de agua libre de RNasa.

Como control, se determina la concentración y la calidad de las muestras mediante espectrofotometría (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer) midiendo absorbancia a 230 nm (para detectar compuestos orgánicos, p.e. fenol, y azúcares), a 260 nm (para ácidos nucleicos) y a 280 nm (para triptófano y aminoácidos aromáticos). Se calcularon las relaciones A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , que en todos los casos fueron mayores a 1,8.

20. b. Tratamiento con DNasa I y purificación de ARN

Se realizó un tratamiento con TURBO DNA-free™ DNase Treatment (Ambion) para eliminar los posibles restos de ADN genómico de la muestra. Posteriormente, las mismas se pasan por un kit para copurificar miRNA y RNA total de cultivos de células, tejidos blandos o tejidos vegetales (RNeasy Mini Kit. Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se repitió la determinación de concentración y calidad de la muestra, y se verificó el estado del ARN por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, observándose ausencia de ADN genómico (de alto peso molecular) y presencia de small RNAs (de bajo peso molecular).

20. c. Ensayos de “microarrays”

El análisis de la integridad del ARN (equipo Agilent 2100 Bioanalyzer), la hibridación y el ensayo de microarray fueron realizados en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, <http://www.cnb.csic.es/index.php/es/servicios/genomica.html>). Los datos transcriptómicos fueron obtenidos utilizando la plataforma de microarrays Salgenomics con oligonucléotidos de 70-mer (229, 230), que cubre el genoma de *Salmonella* Typhimurium SL1344. Para la normalización de los datos del microarray de dos colores, fue utilizado el software LiMMA (231). Los subsiguientes análisis

bioinformáticos fueron realizados con el programa FIESTA y con el programa VENNY (232, 233).

M&M. 21. Herramientas bioinformáticas

El motivo consenso para el sitio de unión de PhoP fue generado entrenando el algoritmo MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*, (234–236)) con los sitios de unión de esta proteína presentes en *Salmonella*. Para generar la matriz de PhoP, se consideraron las regiones promotoras corriente arriba de los genes *slyB*, *phoP*, *mgtA*, *mgtC*, *hila*, *pipD*, *virK*, *pagC*, *pagD*, *pagP*, *pmrD*, *rstA*, *mig-14*, *pgtE*, *hdeD*, *ideA*, *b1825*, *b1826*, *b2833*, *ompT*, *ompX*, *nmpC*, *ybcU*, *ybjX*, *yeaF*, *yhiE*, *yhiW*, *yiaG*, *yrbL*, *yobG*, *trs5_8*, *udg*, y *ugtL*. Se consideró como restricción para el programa que encuentre sólo un motivo en cada secuencia. La matriz obtenida fue luego utilizada en el programa MAST (*Motif Alignment and Search Tool*, (237)) para buscar nuevos motivos en una región del genoma de *Salmonella* que comprende 300 pb corriente arriba y 300 pb corriente abajo de las regiones codificantes para los genes u operones.

M&M. 22. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos cuantitativos se realizó utilizando análisis de la varianza de un factor (*one-way ANOVA*) y la prueba de Holm-Šidák con un nivel de significación de 0,05.

תוספת
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
תוצאות

CAPÍTULO I

**Caracterización del efecto de los
ácidos grasos insaturados sobre el
sistema de dos componentes PhoP/PhoQ
de *Salmonella enterica***

Como parte del trabajo de tesis de la Dra. Mariela Sciara, se efectuó el rastreo de diversos extractos vegetales naturales y la posterior identificación de algunos de ellos con actividad inhibitoria específica sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*. Mediante fraccionamiento bioguiado de uno de ellos (perteneciente a la especie *Lamium amplexicaule*) se estableció la fracción que conserva la actividad inhibitoria, y posteriormente se identificaron los compuestos presentes en el extracto que eran responsables del efecto observado: los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFAs). Se detectó principalmente ácido linoleico, pero también trazas de ácidos palmítico, esteárico y oleico.

Posteriormente, se utilizaron los ácidos grasos puros de origen comercial para verificar que el efecto ejercido por el extracto vegetal era debido a estos componentes presentes en la mezcla. Los resultados mostraron que efectivamente los ácidos grasos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) reprimen la expresión de genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ mientras que no ejercen efecto sobre el gen *tppB*, regulado por el sistema de dos componentes homólogo EnvZ/OmpR. Además, se estableció que esta inhibición es dependiente de la dosis de ácido graso insaturado agregada al medio de cultivo, existiendo un efecto de saturación a partir de 0,5 mg/ml. En ninguno de los casos se observó efecto por parte de los ácidos grasos saturados de igual longitud de cadena carbonada, lo que permite establecer un efecto inhibitorio específico de los LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. En base a estos y otros resultados, se decidió tomar al ácido linoleico (C18:2) como referente para experimentos subsiguientes, y considerar una concentración inhibitoria máxima sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de 0,5 mg/ml, que se ha demostrado es una concentración sub-inhibitoria del crecimiento de *Salmonella Typhimurium*.

Como parte de este trabajo de tesis, se decidió profundizar la caracterización del efecto de estas moléculas sobre el sistema de transducción de señales PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*, aportando más evidencias sobre el mecanismo de acción de las mismas.

R&D. I. 1. Efecto del ácido linoleico sobre el crecimiento de *Salmonella*

Para analizar si la presencia de C18:2 en el medio de cultivo afecta el crecimiento de *Salmonella*, se realizaron curvas de crecimiento en medio Luria-Bertani (LB) en ausencia o presencia del ácido graso. Para ello, los cultivos de cada cepa crecidos toda la noche a 37°C con agitación en medio LB sin adición de ácido graso se diluyeron $1/100$ en medio LB fresco, con o sin agregado de ácido linoleico a concentración final 0,5 mg/ml, y se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) cada 1 hora, manteniendo la agitación y temperatura. Se evaluaron las cepas de *S. Typhimurium* salvaje, *phoPQ*, *fadL* y *fadD*. El gen *fadL* codifica para el transportador de ácidos grasos de membrana externa, mientras que *fadD* codifica para la acil-CoA sintetasa encargada de translocar los ácidos grasos al interior celular junto con su activación con coenzima A. Entonces, por comparación entre las dos primeras cepas determinaremos si la integridad del sistema PhoP/PhoQ es relevante para el normal crecimiento de las bacterias, mientras que el análisis del crecimiento de las mutantes *fadL* y *fadD* nos permitirá determinar si la presencia de una vía de β -oxidación intacta es requerida para el normal crecimiento en las condiciones de nuestros experimentos.

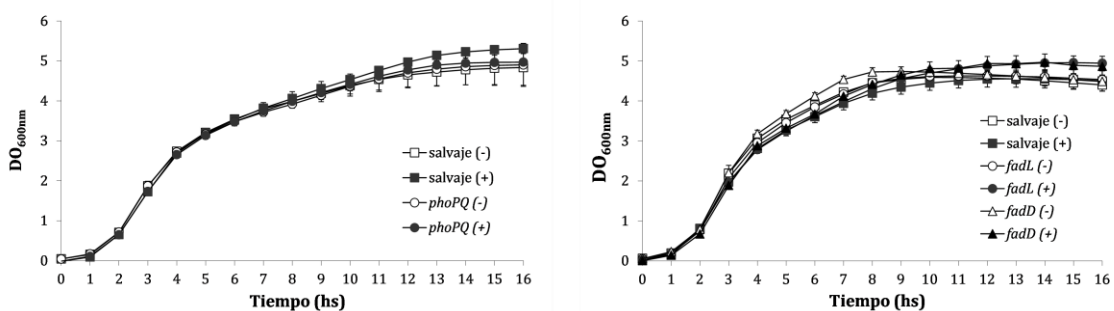


FIGURA R&D.I.1: Patrón de crecimiento de *Salmonella* en medio de cultivo LB en presencia de C18:2. Se muestra la evolución de la DO_{600nm} cada 1 hora para los diferentes cultivos. Se ensayaron las cepas de *S. Typhimurium* salvaje y *phoPQ* (izquierda), o salvaje, *fadL* y *fadD* (derecha), crecidas en ausencia (-) o presencia (+) de 0,5 mg/ml de ácido linoleico en el medio de crecimiento. Los cultivos fueron mantenidos en agitación a 37°C. Los resultados corresponden al promedio de dos ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Como se puede observar en los gráficos de la figura R&D.I.1, la presencia del ácido graso insaturado no modifica significativamente el crecimiento de las distintas cepas de *Salmonella*, respecto al control en medio de cultivo sin agregado del mismo. Estos resultados permiten concluir que, en el medio de crecimiento LB analizado, la

adición de ácido linoleico no confiere ventajas ni desventajas adaptativas a las cepas examinadas. Más aún, realizando el mismo experimento en medio mínimo N con glicerol como fuente de carbono, también pudo establecerse que el agregado de C18:2 no produce variaciones estadísticamente significativas en el patrón de crecimiento bacteriano respecto al control, como se observa en la figura R&D.I.2.

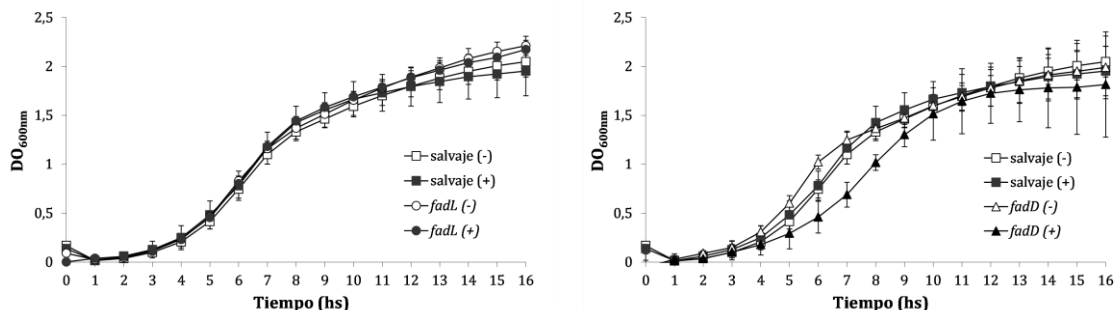


FIGURA R&D.I.2: Patrón de crecimiento de Salmonella en medio mínimo N en presencia de C18:2. Se muestra la evolución de la DO_{600nm} cada 1 hora para los diferentes cultivos. Se ensayaron las cepas de *S. Typhimurium* salvaje y *fadL* (izquierda), o salvaje y *fadD* (derecha), crecidas en ausencia (-) o presencia (+) de 0,5 mg/ml de ácido linoleico en el medio de crecimiento mínimo N con glicerol como única fuente de carbono. Los cultivos fueron mantenidos en agitación a 37°C. Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Estos resultados nos permiten concluir que la ausencia del sistema PhoP/PhoQ y, como consecuencia, la ausencia de modulación de los genes del regulón mediada por este sistema, no altera el crecimiento bacteriano respecto de la cepa salvaje, independientemente de la presencia o ausencia de C18:2 en el medio de cultivo. Por otra parte, la presencia de una vía de β -oxidación de ácidos grasos interrumpida no afecta el patrón de crecimiento de *Salmonella* en comparación con la cepa salvaje, tanto en ausencia como presencia del ácido graso en los medios de cultivo examinados.

R&D. I. 2. Identificación del blanco de acción de LCUFAs sobre el mecanismo de transducción de señales del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

Como se mencionó en la introducción, la transducción de la señal a través del sistema bajo análisis comienza con la detección de la señal específica por parte de la proteína sensora PhoQ, lo que provoca la autofosforilación de la misma en un residuo His conservado. Luego, este fosfato es transferido al factor de transcripción PhoP,

regulando de esta manera la expresión de los genes controlados por dicho regulador transcripcional (98).

Para lograr establecer la etapa en el mecanismo de transducción de la señal que es blanco de los LCUFAs, se ha ensayado en primera instancia la acción de diferentes ácidos grasos insaturados puros sobre la actividad de autofosforilación (actividad autoquinasa) de la histidina-quinasa PhoQ.

Para ello, se sobreexpresó la proteína PhoQ a partir del plásmido pUHE21-2::*phoQ* en una cepa de *S. Typhimurium phoQ* crecida en las diferentes condiciones, y se prepararon vesículas enriquecidas en el sensor por técnicas de fraccionamiento celular, como previamente se ha descrito (98). Este sistema de fraccionamiento celular ha demostrado conservar una proteína PhoQ funcional en su ambiente nativo de la membrana bacteriana, evitando artefactos funcionales o conformacionales que resultan de la solubilización de la proteína con detergentes y la reconstitución en proteoliposomas. Como control de especificidad, se ensayaron las mismas condiciones para preparaciones de membranas de una cepa que sobreexpresa la proteína homóloga EnvZ (con propiedades funcionales y estructurales análogas a PhoQ), histidina-quinasa del sistema de dos componentes osmosensor EnvZ/OmpR, no vinculado funcionalmente con el sistema PhoP/PhoQ (238, 239).

Durante el proceso de preparación de las vesículas enriquecidas en membrana interna es requerido un paso de sonicado para romper las células bacterianas. Al realizar esta ruptura, se obtiene una población mixta de vesículas con orientación correcta u orientación evertida. En las primeras, la orientación de la membrana (cara interna y cara externa) es la misma que en la bacteria intacta, mientras que en la segunda población el lado que en la bacteria se encuentra hacia el interior pasa a estar orientado hacia el exterior, y viceversa con la cara exterior de la membrana bacteriana. Dado que el ATP no atraviesa de modo pasivo las membranas, la población de moléculas de PhoQ o EnvZ para las cuales detectamos actividad autoquinasa a través de la fosforilación con ATP marcado radioactivamente es aquella en una orientación evertida. En esta población, el dominio sensor de las proteínas PhoQ o EnvZ queda orientado hacia el interior de las vesículas, mientras que la porción citoplásmica de las mismas (que contiene el dominio de unión a ATP) queda orientada hacia afuera. Dado que los ácidos grasos insaturados agregados al medio de

cultivo están presentes durante el crecimiento bacteriano, si no han sido consumidos catabólicamente por la bacteria quedarán retenidos en el interior de las vesículas, contactando con el dominio periplásmico de la proteína sensora en la población de vesículas evertidas, las cuales son reveladas luego en la reacción de autofosforilación en presencia de ATP marcado radioactivamente, como ha sido explicado.

Entonces, estas preparaciones de membranas bacterianas enriquecidas en cada sensor se utilizaron en los ensayos de fosforilación, empleando como sustrato [γ - 32 P]ATP marcado radioactivamente. El ensayo consiste en la incubación de las vesículas enriquecidas (50 μ g proteína/reacción) junto con el sustrato radioactivo durante 10' a 37°C, en cada una de las condiciones requeridas. Los resultados se obtienen mediante resolución de las muestras (25 μ g proteína/calle) por PAGE-SDS, transferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior autorradiografía. En paralelo, con las muestras en las mismas condiciones pero sin agregado de ATP radioactivo, se realizaron ensayos de Western-blot para verificar que el tratamiento con el ácido graso no afectara los niveles de expresión o estimulara diferencialmente la degradación de PhoQ o de EnvZ. Estas membranas de nitrocelulosa fueron incubadas primero con anticuerpos policlonales de conejo anti-PhoQ_{cit} o anti-EnvZ_{cit}, y luego con proteína A conjugada a fosfatasa alcalina, acoplada a una reacción de revelado cromogénica usando NBT y BCIP como sustratos. En cada ensayo independiente, luego del revelado, se realizó una densitometría para determinar la intensidad de la banda correspondiente a PhoQ o EnvZ, tanto en la placa autorradiográfica como en la membrana del Western blot. En base a estos datos se estandarizó, dentro de cada condición, la señal obtenida en la placa respecto a aquella obtenida en el Western blot. Con los resultados de 3 ensayos independientes se realizaron los promedios y las desviaciones estándar, y se graficaron en función de cada ácido graso, para la proteína sensora en estudio (PhoQ) y el control de especificidad (EnvZ). Los valores se relativizaron tomando como 100% la señal en presencia de los agentes vehiculizantes de los ácidos grasos saturados e insaturados (tergitol y etanol), según correspondiera.

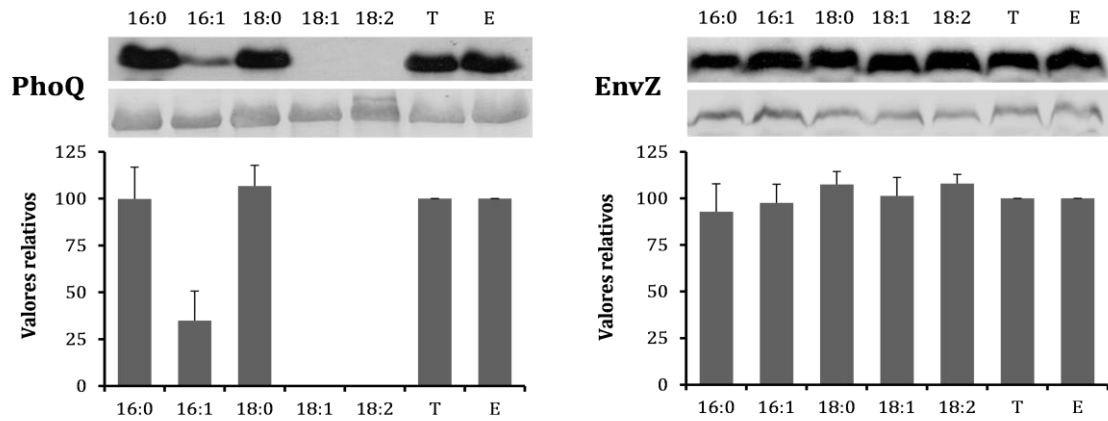


FIGURA R&D.I.3: La actividad autoquinasa de PhoQ es el blanco de acción específico de los ácidos grasos insaturados. Las células de *S. Typhimurium* fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de los ácidos grasos saturados o insaturados indicados (o la cantidad equivalente de los solubilizantes de los mismos, tergitol o etanol, respectivamente). Las membranas obtenidas por fraccionamiento celular, conteniendo PhoQ o EnvZ, fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en el medio de reacción conteniendo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Las reacciones de autofosforilación fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de autorradiografía (imagen superior) o inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit} o anti-EnvZ_{cit} (imagen central). Los niveles de fosforilación y los niveles de expresión proteica de PhoQ o EnvZ en cada condición ensayada fueron determinados por densitometría (como se explica en el texto), y la relación entre la señal obtenida en la placa autorradiográfica y la obtenida por inmunodetección fue graficada (gráfico inferior), tomando como 100% los valores obtenidos para el medio LB con agregado de tergitol o etanol, cuando los ácidos grasos saturados o insaturados fueron utilizados, respectivamente. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de tres ensayos independientes. Los ácidos grasos se indican como: (16:0) ácido palmítico, (16:1) ácido palmitoleico, (18:0) ácido esteárico, (18:1) ácido oleico, y (18:2) ácido linoleico. (T) y (E) señalan los controles en los que sólo se adicionó tergitol (vehículo de los ácidos grasos saturados) o etanol (vehículo de los ácidos grasos insaturados), respectivamente, en concentración final utilizada en el ensayo.

Como puede apreciarse en la figura R&D.I.3, los ácidos grasos insaturados oleico (18:1) y linoleico (18:2) inhiben completamente la actividad autoquinasa de PhoQ al ser agregados exógenamente al medio de cultivo, mientras que el ácido palmitoleico (16:1) sólo lo hace parcialmente (aproximadamente en un 65%). Por otro lado, ninguno de los ácidos grasos saturados ensayados mostró modificar la actividad de autofosforilación de la proteína sensora. Para el caso de la proteína EnvZ, ninguno de los ácidos grasos utilizados afectó la actividad autoquinasa de la misma, respecto a los controles con los respectivos vehiculizantes de los mismos. Además, en ninguna de las condiciones ensayadas se observó degradación o expresión diferencial de las proteínas, indicando que los efectos observados son específicamente sobre la actividad catalítica autoquinasa de PhoQ.

Estos resultados se encuentran en concordancia con aquellos obtenidos en los ensayos de actividad β -galactosidasa (184), y nos permiten concluir que existe un efecto represor específico de los ácidos grasos insaturados sobre el sistema de dos

componentes PhoP/PhoQ, y que el blanco de acción de los mismos es la actividad autoquinasa de la proteína sensora PhoQ.

Teniendo en cuenta la ausencia de inhibición sobre la actividad autoquinasa de EnvZ por parte de los LCUFAs, podemos descartar un posible efecto inhibitorio no específico por parte de los ácidos grasos insaturados sobre la actividad del dominio catalítico conservado de las histidina-quinasas, que prevendría la autofosforilación en presencia de ATP. De todas maneras, decidimos verificar que la adición de C18:2 al medio de reacción no ejerciera efecto alguno sobre la capacidad de autofosforilación de PhoQ. En estas condiciones, tanto C18:2 como el ATP marcado radioactivamente se contactarán con el dominio catalítico de PhoQ al ser adicionados desde el exterior. Para ello, se tomaron preparaciones de membranas crecidas en ausencia de C18:2 y el mismo fue agregado al medio de reacción de autoquinasa a concentración final 0,5 mg/ml.

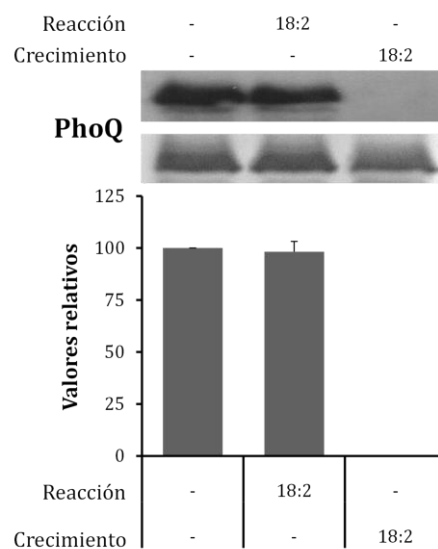


FIGURA R&D.1.4: La actividad autoquinasa de PhoQ no se ve afectada por la presencia de ácido linoleico en el medio de reacción. Las células de *S. Typhimurium* fueron crecidas en medio de cultivo LB sin agregado (-) o con adición de 0,5 mg/ml de ácido linoleico (18:2). Las membranas conteniendo PhoQ, obtenidas por fraccionamiento celular, fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en el medio de reacción conteniendo [γ - 32 P]ATP solo (-) o con el agregado de ácido linoleico (18:2) a una concentración final de 0,5 mg/ml cuando se indica. Las reacciones de autofosforilación fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de autorradiografía (imagen superior) o inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit} (imagen central). Los niveles de fosforilación y los niveles de expresión proteica de PhoQ en cada condición ensayada fueron determinados por densitometría, y la relación entre la señal obtenida en la placa autorradiográfica y la obtenida por inmunodetección fue graficada (gráfico inferior). El valor obtenido para la condición sin agregados al medio de cultivo ni al medio de reacción fue tomado como 100%. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Los resultados mostrados en la figura R&D.I.4 confirman lo previamente postulado respecto a que la presencia del ácido graso insaturado en el medio de reacción no produce modificación de la actividad autoquinasa de la proteína sensora, descartando una posible inhibición inespecífica sobre la capacidad de autofosforilación de PhoQ por competencia con el sustrato ATP.

Continuando con la caracterización del mecanismo de acción sobre la actividad autoquinasa de PhoQ, se realizó el mismo experimento pero utilizando preparaciones de membranas obtenidas a partir de células crecidas en concentraciones crecientes de ácido linoleico. Nuevamente, el ácido graso insaturado se encuentra presente durante el crecimiento bacteriano y, al realizar el fraccionamiento celular para la preparación de las vesículas enriquecidas en membrana interna, el C18:2 queda retenido en el interior de las mismas, en contacto con el dominio sensor de la histidina-quinasa PhoQ. Este ensayo permitió establecer que existe una inhibición parcial de la capacidad de autofosforilación a partir de una concentración de 0,05 mg/ml (50 µg/ml) y que la misma se produce en una manera dependiente de la dosis del ácido graso presente en el medio de crecimiento bacteriano (figura R&D.I.5).

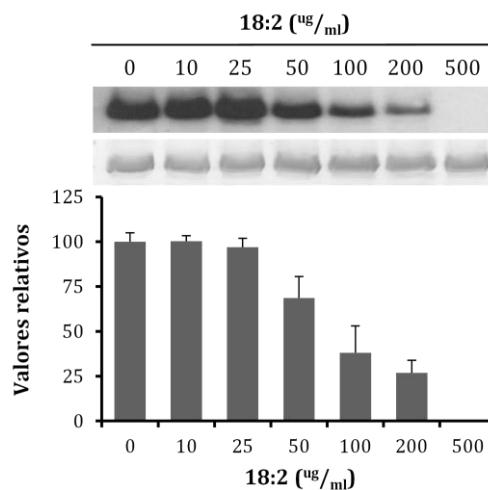


FIGURA R&D.I.5: La inhibición sobre la actividad autoquinasa de PhoQ es dependiente de la dosis de ácido linoleico presente en el medio de crecimiento bacteriano. Las células de *S. Typhimurium* fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de las cantidades indicadas de ácido linoleico (18:2). Las membranas conteniendo PhoQ, obtenidas por fraccionamiento celular, fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en el medio de reacción conteniendo [γ - 32 P]ATP, como se describió previamente. Las reacciones de autofosforilación fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de autorradiografía (imagen superior) o inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit} (imagen central). Los niveles de fosforilación y los niveles de expresión proteica de PhoQ en cada condición ensayada fueron determinados por densitometría, y la relación entre la señal obtenida en la placa autorradiográfica y la obtenida por inmunodetección fue graficada (gráfico inferior). El valor obtenido para la condición sin agregados al medio de cultivo fue tomado como 100%. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Se ha reportado previamente que Mg^{2+} en concentraciones milimolares es un inhibidor del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (101), y que esta acción es debida a la inducción de la actividad PhoP-fosfatasa de la histidina quinasa bifuncional PhoQ (98). Por lo tanto, decidimos analizar el efecto sobre la actividad autoquinasa de PhoQ al adicionar Mg^{2+} y ácido linoleico simultáneamente al medio de cultivo bacteriano. El resultado mostrado en la figura R&D.I.6 corrobora lo previamente descrito, demostrando que la adición de cantidades crecientes de Mg^{2+} al medio de cultivo, que son represoras para la expresión de los genes PhoP-regulados, no afecta los niveles de autofosforilación de PhoQ y, además, prueba que el agregado al medio de cultivo del catión en combinación con C18:2 no interfiere con la represión ejercida por éste último sobre la actividad autoquinasa de PhoQ.

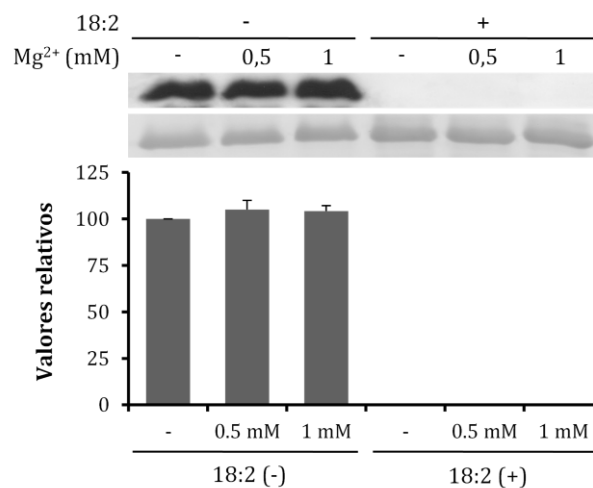


FIGURA R&D.I.6: La acción de Mg^{2+} y C18:2 es sobre diferentes actividades de la histidina-quinasa bifuncional PhoQ. Las células de *S. Typhimurium* fueron crecidas en medio de cultivo LB sin agregado (-) o con adición (+) de 0,5 mg/ml de ácido linoleico (18:2) más las concentraciones indicadas de $MgCl_2$. Las membranas conteniendo PhoQ, obtenidas por fraccionamiento celular, fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en el medio de reacción conteniendo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, como se describió previamente. Las reacciones de autofosforilación fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de autorradiografía (imagen superior) o inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit} (imagen central). Los niveles de fosforilación y los niveles de expresión proteica de PhoQ en cada condición ensayada fueron determinados por densitometría, y la relación entre la señal obtenida en la placa autorradiográfica y la obtenida por inmunodetección fue graficada (gráfico inferior). El valor obtenido para la condición sin agregados al medio de cultivo fue tomado como 100%. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de tres ensayos independientes.

En conjunto, estos resultados revelan que los ácidos grasos insaturados de cadena larga (de 16 a 18 átomos de carbono) poseen una acción inhibitoria específica sobre la actividad de autofosforilación de PhoQ, e indican que el blanco de acción funcional de los mismos difiere del previamente descrito para Mg^{2+} en el sensor PhoQ (98). Como parte de la tesis doctoral de la Dra. Mariela Sciara se determinó,

mediante ensayos de medida de actividad β -galactosidasa del gen reportero PhoP-dependiente *virK*, que el efecto inhibitorio cuando Mg^{2+} y ácido linoleico están presentes de manera simultánea en el medio de cultivo bacteriano es mayor que el observado cuando cada inhibidor está presente individualmente, lo que aporta consistencia a la conclusión obtenida a partir de nuestros ensayos de actividad autoquinasa. De esta manera, los cationes divalentes y los ácidos grasos insaturados de cadena larga actúan promoviendo la actividad fosfatasa e inhibiendo la actividad autoquinasa, respectivamente, de la proteína sensora PhoQ, lo que se traducirá en una disminución de los niveles de PhoP fosforilado, con la concomitante represión de la expresión del regulón PhoP/PhoQ.

R&D. I. 3. Relación entre la vía de β -oxidación y el efecto inhibitorio de los LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

El ácido linoleico, al igual que los demás ácidos grasos de cadena larga, son metabolizados en *Salmonella* a través de la vía de β -oxidación, para permitir su incorporación a los fosfolípidos de la membrana bacteriana o para generar, en última instancia como resultado de la oxidación completa de los mismos, acetil-CoA (189, 191). Previamente, se ha reportado que acetil-CoA ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad autoquinasa de PhoQ en *Escherichia coli* (215), por lo que se evaluó si el aumento en la concentración intracelular de acetil-CoA o de algún intermediario de la vía metabólica era responsable del efecto represor observado sobre el regulón PhoP/PhoQ.

Para ese fin, se trabajó con mutantes delecionadas en los genes que codifican para las enzimas de los distintos pasos de la vía de β -oxidación, a saber: *fadL*, enzima responsable del transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana externa; *fadD*, enzima encargada de la captación de los mismos e ingreso al interior celular, concomitantemente con activación del ácido graso con la coenzima A (CoA); y *fadBA*, enzimas responsables de los ciclos iterativos de deshidrogenación del ácido graso (194). En primera instancia, como parte de la tesis de la Dra. Mariela Sciara, se realizaron las fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de los promotores de los genes *fad* mencionados. Mediante medidas de actividad β -galactosidasa de los mismos, tanto en un entorno salvaje como *phoP*, se pudo

determinar que no existe una regulación por parte del sistema PhoP/PhoQ en la expresión de los genes *fad* (184).

A continuación, se evaluó la actividad de los genes reporteros *virK::lacZ* y *tppB::lacZ* en los entornos salvaje y mutantes en los genes *fad*, tanto en medio de cultivo LB sin agregado como con adición de MgCl₂ 5 mM o ácido linoleico 0,5 mg/ml. Como se observa en la figura R&D.I.7, la inhibición transcripcional del gen reportero PhoP-regulado *virK* ocurre tanto en las cepas salvaje como *fad* cuando son crecidas en medio LB + Mg²⁺, mientras que la actividad transcripcional del gen reportero *tppB* no se vio alterada en ninguno de los entornos mutantes ni en ninguna de las condiciones ensayadas.

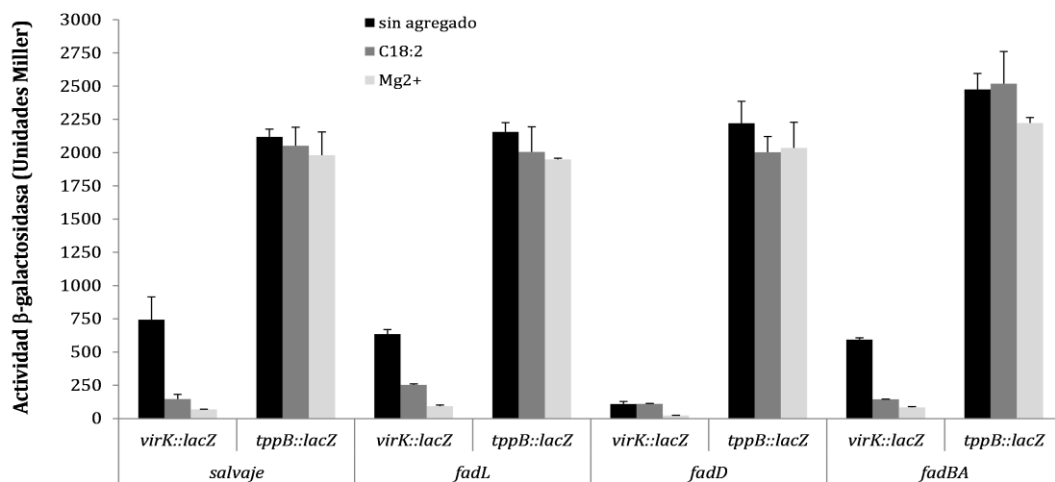


FIGURA R&D.I.7: La integridad de la vía de β -oxidación no es requerida para la represión del sistema PhoP/PhoQ por parte de los LCUFAs. La actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *virK::lacZ* y *tppB::lacZ* en entornos génicos salvaje, *fadL*, *fadD* o *fadBA* fue medida a partir de células crecidas toda la noche a 37°C en agitación, en medio de cultivo LB sin agregado o suplementado con MgCl₂ 5 mM o ácido linoleico 0,5 mg/ml (C18:2), según se indica. Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Los resultados muestran que en los entornos génicos *fadL* y *fadBA* el agregado de C18:2 al medio de crecimiento produce inhibición de la actividad transcripcional del gen reportero *virK*, de manera equivalente a lo observado en el entorno salvaje. Para el caso del entorno *fadBA*, los niveles de inhibición son similares a los obtenidos en la cepa salvaje (75% versus 80%, respectivamente), mientras que cuando mutamos el gen *fadL* la inhibición es de un 60%, aproximadamente, respecto

a la misma cepa sin agregado de C18:2. Si bien una cepa mutante en la proteína FadL, el transportador de ácidos grasos de membrana externa, sería incapaz de incorporar estos compuestos al periplasma celular, ha sido reportado que los LCUFAs son capaces de atravesar la membrana externa por un mecanismo de difusión pasiva, aunque su acumulación no sería suficiente para permitir el crecimiento cuando los mismos son la única fuente de carbono presente en el medio de cultivo (240). Esta menor disponibilidad de ácidos grasos libres en el periplasma de una cepa *fadL* permitiría explicar los menores niveles de represión que se observan en este entorno mutante (60% de inhibición para la cepa *fadL* respecto a 75% u 80% en las cepas *fadBA* y salvaje, respectivamente). Por otra parte, la inhibición de la actividad transcripcional del reportero *virK::lacZ* cuando están delecionados los genes que codifican para las últimas enzimas de la vía de β -oxidación, FadB y FadA, descartaría que un aumento en el nivel intracelular de acetyl-CoA por adición de ácidos grasos de manera externa sea el responsable del efecto represor observado sobre el sistema PhoP/PhoQ.

Por otra parte, se observa en la figura R&D.I.7 que en el entorno *fadD* existe una reducción de aproximadamente 7 veces en los niveles de actividad basal de *virK* (figura R&D.I.7, LB sin agregado), impidiendo una evaluación precisa del efecto del ácido graso insaturado sobre la expresión del gen reportero PhoP-regulado.

Como se mencionó previamente, FadD es la enzima, anclada en la membrana interna, requerida para captar los ácidos grasos de cadena larga, translocarlos al interior celular, y activarlos por unión a la coenzima A, formando el acil-CoA respectivo. Estos acil-CoA pueden ser degradados por la ruta β -oxidativa o usados como dadores de ácidos grasos para la esterificación en los fosfolípidos de membrana por la vía dependiente de PlsB/PlsC (241). En consecuencia, la reducción en la expresión de *virK* en la mutante *fadD* respecto de los niveles de la cepa isogénica salvaje puede ser atribuida a niveles disminuidos de expresión de PhoQ, a reducida actividad autoquinasa de la proteína PhoQ debido a cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana donde el sensor se encuentra anclado, o a la acumulación de LCUFAs incorporados a partir del medio de cultivo que no pueden ser transportados vectorialmente al citoplasma y por lo tanto inhiben la actividad autoquinasa de PhoQ, lo que va a provocar una disminución en la expresión de *phoQ* debido al mecanismo de autoregulación de *phoPQ* (125).

Para explorar esta cuestión, se realizó el ensayo de actividad autoquinasa, como se describió previamente, utilizando vesículas conteniendo a PhoQ pero obtenidas a partir de una cepa mutante en *fadD*, crecida en medio de cultivo LB con o sin el agregado de C18:2. En este ensayo, debido a que la expresión es controlada por el promotor *lacl^q*, la expresión de PhoQ es independiente del mecanismo autoregulatorio de *phoPQ*. Como se observa en la figura R&D.I.8, hay una reducción en los niveles de actividad autoquinasa de PhoQ en una mutante en *fadD* en comparación con la cepa salvaje en medio de cultivo LB sin agregado del ácido graso. Como se puede apreciar por inmunodetección, esta disminución se relaciona con menores niveles de PhoQ en estado estacionario en la cepa *fadD* respecto a la cepa salvaje (figura R&D.I.8, imágenes superiores). Este resultado se puede atribuir a un ensamblado defectuoso o a una degradación incrementada de PhoQ en este fondo genético, y esta observación contribuye a explicar la baja expresión transcripcional basal de *virK* observada en la mutante *fadD* en los resultados de actividad β -galactosidasa previamente mostrados (figura R&D.I.7).

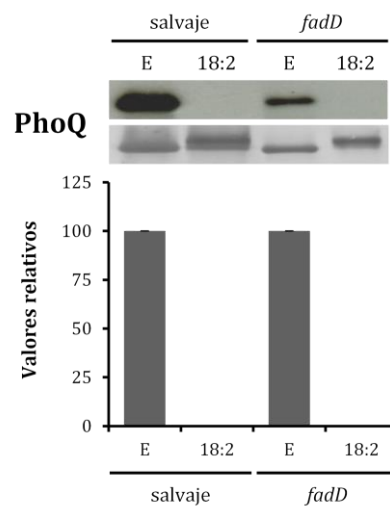


FIGURA R&D.I.8: La inhibición de la actividad autoquinasa de PhoQ por LCUFAs es independiente de *fadD*. Las células de *S. Typhimurium* salvaje o *fadD* fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de ácido linoleico (18:2) o la cantidad equivalente del solubilizante del mismo (etanol, E). Las membranas conteniendo PhoQ, obtenidas por fraccionamiento celular, fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en el medio de reacción conteniendo [γ -³²P]ATP, como se describió previamente. Las reacciones de autofosforilación fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de autorradiografía (imagen superior) o inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit} (imagen central). Los niveles de fosforilación y los niveles de expresión proteica de PhoQ en cada condición ensayada fueron determinados por densitometría, y la relación entre la señal obtenida en la placa autorradiográfica y la obtenida por inmunodetección fue graficada (gráfico inferior), tomando como 100% los valores obtenidos para el medio LB con agregado de etanol. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Sin embargo, no se detectó señal de autofosforilación de PhoQ en las autorradiografías provenientes de las muestras obtenidas tanto de una cepa salvaje

como *fadD* crecidas en medio de cultivo en presencia de C18:2, respecto a los controles respectivos provenientes de bacterias crecidas en medio LB sin agregado (figura R&D.I.8, imágenes superiores). En conjunto, estos resultados muestran claramente que los LCUFAs agregados de forma externa ejercen un efecto represor sobre la actividad autoquinasa de PhoQ independientemente de su destino metabólico en la célula bacteriana.

Estos resultados permiten descartar que la acción inhibitoria sobre PhoQ por parte de los LCUFAs sea debida a cambios en la composición de fosfolípidos de la envoltura bacteriana mediados por FadD, lo cual perturbe la actividad catalítica de la proteína PhoQ anclada en la membrana.

En *E. coli* existen dos vías para la incorporación de ácidos grasos exógenos a los fosfolípidos. Luego de ser traslocados al interior celular por la enzima FadL, los ácidos grasos intracelulares pueden ser activados por la acil-CoA sintetasa o por la acil-ACP sintetasa. Los acil-CoA sirven como sustrato para la vía de la β -oxidación de ácidos grasos, o para el sistema de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa PlsB y de la 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa PlsC, que incorpora los mismos a los fosfolípidos de membrana. Por su parte, los acil-ACP son intermediarios en la incorporación de ácidos grasos a la posición 1 de la fosfatidiletanolamina, en el proceso de recambio de los fosfolípidos. Entonces, como se mencionó previamente, una mutante *fadD* es incapaz de canalizar los ácidos grasos hacia las vías de β -oxidación o de síntesis de fosfolípidos, con la única excepción de la vía 2-acil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina aciltransferasa/acil-ACP sintetasa. Sin embargo, se ha observado que esta vía incorpora preferentemente ácidos grasos saturados, y que la tasa de incorporación de estas especies es 5 veces mayor que la tasa de incorporación de ácidos grasos insaturados (242–244). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que cepas mutantes *fadD* tanto de *Escherichia coli* como de *Sinorhizobium meliloti* acumulan ácidos grasos insaturados libres que han sido liberados de los fosfolípidos de la membrana en fase estacionaria de crecimiento. Más aún, los ácidos grasos no se acumulan y son metabolizados en una mutante en *fadL*, sugiriendo que los ácidos grasos libres que se acumulan en una cepa *fadD* son de origen intracelular. Por lo tanto, se propuso que la proteína FadD, además de ser la responsable de la activación de los LCUFAs exógenos con la coenzima A, es requerida para la utilización de ácidos grasos endógenos que pueden haber sido liberados como

resultados del remodelamiento de lípidos de la membrana (245). En base a todos estos antecedentes, es razonable especular que cuando los LCUFAs son provistos al medio de cultivo bacteriano, la interacción de PhoQ con los ácidos grasos insaturados acumulados sea la responsable de la inducción de un cambio conformacional que inactive la actividad autoquinasa de la proteína sensora.

Para examinar esta hipótesis en *Salmonella*, se compararon mediante análisis por cromatografía en capa delgada (TLC) los niveles de ácidos grasos libres versus esterificados en cepas salvaje, *fadL* y *fadD* cuando fueron crecidas en presencia de C18:2 marcado. Brevemente, el protocolo consiste en crecer las células durante toda la noche en medio de cultivo LB sin agregados, y luego realizar una dilución $1/100$ en medio de crecimiento LB fresco suplementado con $0,5 \text{ mg/ml}$ de ácido linoleico y $0,075 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ de $[1-^{14}\text{C}]$ C18:2. Las células son crecidas durante 5 hs a 37°C en agitación. Las mismas se cosechan por centrifugación, se lavan con buffer PBS pH 7,4, y se resuspenden en $200 \text{ } \mu\text{l}$ del mismo buffer. Los lípidos son extraídos durante 3 días a -20°C de acuerdo al método de Blight & Dyer (228), y sembrados en una placa TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), previamente secada durante 60' a 80°C . Mediante esta técnica, los lípidos fueron resueltos utilizando una mezcla de solventes de corrida compuesta por Eter dietílico:Bencina de petróleo:Ácido acético (70:30:2 v/v/v), que logra la separación de los ácidos grasos libres (que migran con el frente de corrida) de los ácidos grasos esterificados (que quedan retenidos en el punto de siembra). La placa de TLC fue expuesta durante una noche a una pantalla Storage Phospho Screener, y las señales fueron detectadas y analizadas mediante el sistema Amersham Storm Imaging System equipado con el programa Storm Scanner Control.

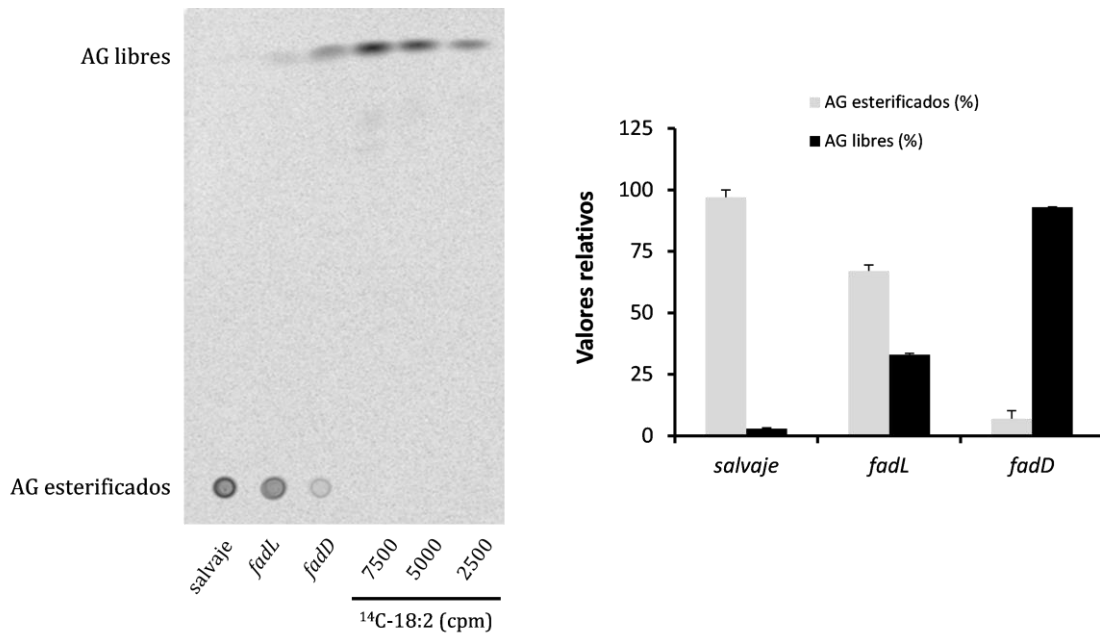


FIGURA R&D.I.9: Distribución de ácidos grasos en Salmonella. La cromatografía en capa delgada (TLC) fue realizada con los lípidos extraídos a partir de cultivos de las cepas indicadas de *Salmonella* crecidos en presencia de $[1-^{14}\text{C}]$ C18:2 marcado, según lo descrito en el texto. Las muestras fueron sembradas en una placa TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), y los lípidos fueron resueltos empleando una mezcla de solventes de corrida de Eter dietílico:Bencina de petróleo:Ácido acético (70:30:2 v/v/v). 7500, 5000 y 2500 cuentas por minuto (cpm) de C18:2 marcado fueron sembradas como controles del ensayo (izquierda). La densitometría fue realizada para los puntos mayoritarios observados en la TLC. El porcentaje de ácidos grasos (AG) libres y esterificados respecto al contenido total de lípidos fue calculado y graficado para cada cepa (derecha). Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de dos ensayos independientes.

Como se muestra en la figura R&D.I.9, los ácidos grasos libres representan 33% del total de marca incorporada a la bacteria en la cepa *fadL* y 93% en la mutante *fadD* en comparación con un 3% en el entorno salvaje. Este resultado apoya la hipótesis de que los LCUFAs libres, acumulados ya sea por bloqueo del transporte vectorial al citoplasma bacteriano y/o por una sobrecarga exógena de la capacidad de la célula, serían las especies activas que actúan como señales reprimiendo la actividad autoquinasa de PhoQ. Estos resultados también indican que la disminución en los niveles de expresión basal del gen regulado por PhoP observada en la cepa mutante en *fadD* (figura R&D.I.7) es atribuible a una reducción en la actividad de autofosforilación de PhoQ causada por la acumulación de LCUFAs junto con reducidos niveles proteicos de PhoQ, debido a la autoregulación de *phoPQ* combinada con menores niveles de proteína PhoQ expresada (ya sea por disminución de su expresión o aumento de su degradación) en un entorno *fadD*.

Hasta el momento, no fue posible determinar a nivel molecular el modo de acción de los LCUFAs sobre la histidina-quinasa PhoQ. Es posible hipotetizar que la disminución en los niveles de transcripción de genes dependientes de PhoP en presencia de ácidos grasos insaturados podría deberse a: 1) actividad autoquinasa disminuida debida a un incremento en la hidrofobicidad de la membrana en las proximidades de la proteína PhoQ, 2) a cambios conformacionales, particularmente en la estructura de los dominios transmembrana, provocados por modificaciones en la fluidez de membrana debido a la presencia de LCUFAs, o 3) a una interacción directa de los ácidos grasos, actuando como ligandos, con la región sensora de PhoQ.

En este sentido, Goldberg y cols. mostraron la importancia de las interacciones polares dentro de la región transmembrana 2 (TM2) de la proteína PhoQ de *E. coli* para la señalización (246). En este trabajo, identificaron un residuo asparagina (Asn) crítico en la región TM2, cuyo reemplazo por otros aminoácidos hidrofóbicos impidió la transcripción de genes dependientes de PhoQ. Además, se demostró que la actividad quinasa de PhoQ dependió de la polaridad de este residuo Asn202 y no de su estructura o posición dentro de la región TM, sin verse afectada la actividad fosfatasa de la proteína. Por lo tanto, la hidrofobicidad de este aminoácido sería esencial para el funcionamiento de la histidina-quinasa, porque estabilizaría una cavidad estructural conteniendo moléculas de agua. Esta estabilización sería fundamental para el mecanismo de señalización, ya que podría dar lugar a los cambios conformacionales requeridos para el equilibrio entre las conformaciones quinasa y fosfatasa de la proteína sensora. Es posible especular que una modificación en el entorno hidrofóbico del TM2, generada por la acumulación de LCUFAs, pueda provocar un efecto análogo e inducir un cambio conformacional en la proteína PhoQ que bloquee su capacidad de autofosforilación.

Por otro lado, en *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que la histidina-quinasa DesK es capaz de sensorar una disminución en la fluidez de membrana, provocada por una disminución en la temperatura de crecimiento (247) o por una limitación en la síntesis de ácidos grasos con cadena ramificada ante-iso (248). DesK detecta los cambios en la fluidez de la membrana a través de sus segmentos transmembrana, transfiriendo un cambio conformacional dentro de la membrana al dominio C-terminal de la proteína sensora y regulando la relación entre las actividades quinasa y fosfatasa (249, 250). Éste podría ser un mecanismo común para un gran

grupo de histidina-quinasas. De este modo, los cambios estructurales observados en DesK son compatibles con las rotaciones en las hélices provocadas por la señal inductora, observadas en el dominio HAMP (65), presente en las regiones conectoras de la membrana de varias histidina-quinasas (57), entre ellas PhoQ.

Por último, cabe mencionar que en *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, una infección intestinal aguda, se ha descrito un mecanismo de virulencia que involucra la detección de LCUFAs (251). Chatterjee y cols. demostraron que LCUFAs aislados de bilis son capaces de inhibir la expresión de factores de virulencia a una concentración de 0,03% (0,3 mg/ml), mientras que incrementan la motilidad de *V. cholerae*. La patogenicidad de *V. cholerae* es debida principalmente a la producción de la toxina colérica (CT) y de un pilus co-regulado por toxina (TCP), que se hipotetiza son esenciales para la colonización del epitelio intestinal por esta bacteria. La expresión de CT, TCP y otros factores de virulencia es controlada por la expresión de una cascada de proteínas regulatorias comprendidas en el regulón ToxR, donde las proteínas de unión a ADN de membrana interna ToxR y TcpP activan la expresión de ToxT, un regulador transcripcional que es requerido para la expresión de los genes *ctxAB* (*cholera toxin*) y *tcpA* (*toxin co-regulated pilus*), así como otros genes de virulencia (251). Posteriormente, el trabajo de Lowden y cols. comprobó que la unión directa de LCUFAs a ToxT provoca una alteración conformacional en este regulador maestro de la virulencia, disminuyendo su capacidad de unir al ADN y reprimiendo la transcripción de los genes *tcp* y *ctx* (252).

Dado que no fue posible encontrar un motivo de reconocimiento para ácidos grasos insaturados libres mediante un análisis *in silico* a partir de la secuencia aminoacídica de PhoQ o de sus características estructurales, será necesario llevar a cabo nuevos experimentos para determinar las bases moleculares de la interacción LCUFAs-PhoQ.

R&D. I. 4. Caracterización del efecto represor de LCUFAs sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

4. a. Naturaleza del efecto represor de C18:2

Continuando con la caracterización del modo de acción de los ácidos grasos insaturados sobre el sistema en estudio, decidimos evaluar si el efecto ejercido por

los mismos era de naturaleza reversible o irreversible. Para ello se realizaron medidas de actividad β -galactosidasa utilizando los genes reporteros *virK* y *tppB*, a partir de células crecidas hasta fase estacionaria en medio de cultivo LB con agregado de ácido linoleico, y a distintos tiempos luego de diluir este cultivo en medio de crecimiento LB fresco sin agregado del mismo.

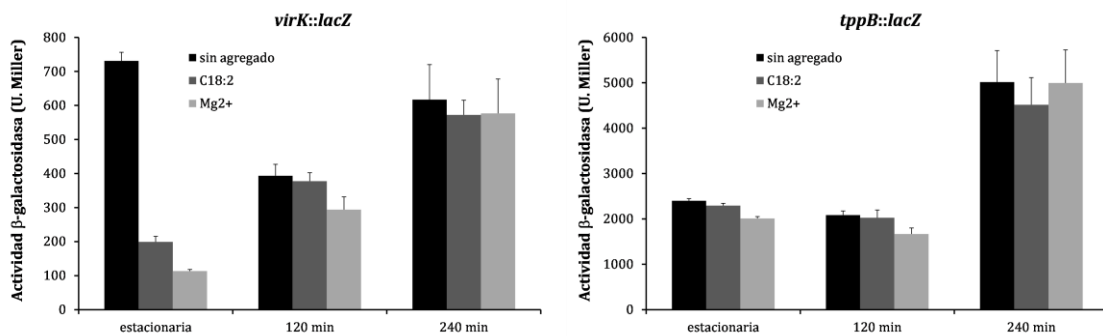


FIGURA R&D.I.10: Inhibición reversible del ácido linoleico sobre la expresión del gen PhoP-activado *virK*. La actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *virK::lacZ* (izquierda) y *tppB::lacZ* (derecha) fue medida en células crecidas toda la noche (estacionaria) en medio de cultivo LB sin agregados o suplementado con ácido linoleico 0,5 mg/ml (C18:2) o MgCl₂ 5 mM. Luego, las células de cada condición fueron diluidas 1/100 en medio LB fresco, y la actividad β -galactosidasa fue medida a los tiempos indicados. Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Los resultados de la figura R&D.I.10 muestran que hay una reversión completa en el efecto inhibitorio sobre el gen reportero *virK* cuando los LCUFAs son removidos del medio de cultivo, indicando que la acción represora de los mismos sobre la actividad del sistema PhoP/PhoQ es de naturaleza reversible. Además, la reversibilidad de la represión ejercida por Mg²⁺ y el efecto nulo ejercido sobre los niveles de expresión del gen reportero *tppB* en todas las condiciones ensayadas se muestran como controles. Si bien estos resultados no son determinantes, aportan más evidencias para soportar la hipótesis de que los mismos podrían estar actuando como moléculas señalizadoras de la proteína sensora PhoQ, ya sea como ligandos de la misma o alterando el microambiente de la bicapa lipídica en la cual la histidina-quinasa se encuentra inserta.

4. b. Efecto resultante de la combinación de dos ácidos grasos insaturados

Hasta este punto todos los ensayos y análisis se han realizado utilizando los ácidos grasos puros de manera individual, de modo de poder establecer el efecto

particular que ejerce cada uno de ellos sobre el sistema PhoP/PhoQ. Sin embargo, en condiciones fisiológicas los mismos no se hallan en forma aislada sino presentes en mezclas complejas, que incluyen tanto otros ácidos grasos (saturados e insaturados) como otros compuestos de diversa naturaleza, como en el caso de la secreción biliar. Entonces, en estas mezclas complejas, es posible que la conjunción de dos o más compuestos produzca efectos aditivos, sinérgicos o antagonísticos. Es por ello que como primera aproximación decidimos estudiar la respuesta del regulón PhoP frente a la acción de dos ácidos grasos insaturados cuando ambos se encontraban presentes en forma conjunta en el medio de crecimiento bacteriano, en diferentes proporciones, respecto a su efecto de manera individual.

Para ello, la cepa conteniendo la fusión transcripcional al gen reportero *virK* fue crecida en medio de cultivo LB con agregado de distintas concentraciones de los ácidos grasos oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), de manera individual o en una combinación de ambos. Luego del crecimiento a 37°C en agitación durante toda la noche, los cultivos se utilizaron para realizar las medidas de actividad β -galactosidasa. En la figura R&D.I.11 se pueden observar los resultados obtenidos para el caso de los ácidos grasos insaturados presentes de manera individual en el medio de crecimiento bacteriano. Se verifica la inhibición dependiente de la dosis del LCUFA agregado al medio de cultivo, y también el efecto represor ligeramente mayor de C18:2 respecto a C18:1, como previamente había observado la Dra. Mariela Sciara durante su trabajo de tesis doctoral.

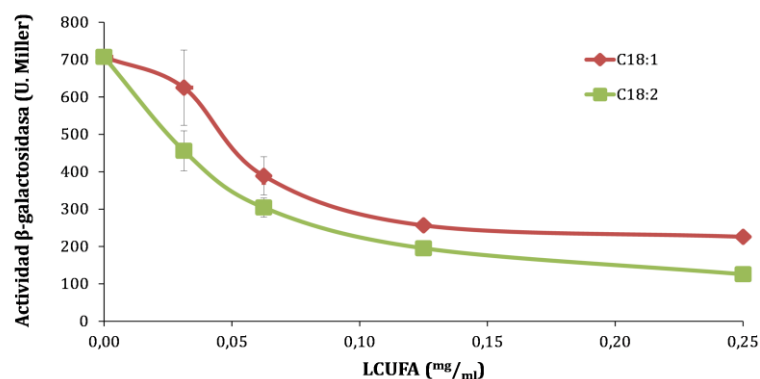


FIGURA R&D.I.11: Efecto dosis-dependiente de los ácidos grasos insaturados en forma individual. La actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional *virK::lacZ* fue medida a partir de células crecidas toda la noche a 37°C en agitación, en medio de cultivo LB sin agregado o suplementado con las cantidades finales indicadas de ácido oleico (C18:1) o ácido linoleico (C18:2). Los resultados corresponden al promedio de dos ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En paralelo, se realizaron las mismas medidas a partir de células crecidas en medio de cultivo LB en el cual se mantuvo fija la concentración de ácido oleico (0,125, 0,0625 o 0,03125 mg/ml) y se agregaron cantidades crecientes de ácido linoleico (desde 0 hasta 0,125 mg/ml). Los resultados obtenidos para estas medidas en presencia de una combinatoria de ácidos grasos insaturados se muestra en la figura R&D.I.12. Para poder realizar una mejor comparación, se graficó en el centro de cada grupo la condición correspondiente a los ácidos grasos combinados (en azul), a continuación a cada lado la condición de cada ácido graso individual en una concentración igual a la suma de las concentraciones en la combinatoria, y luego cada ácido graso en forma individual en la concentración utilizada en la condición de combinación.

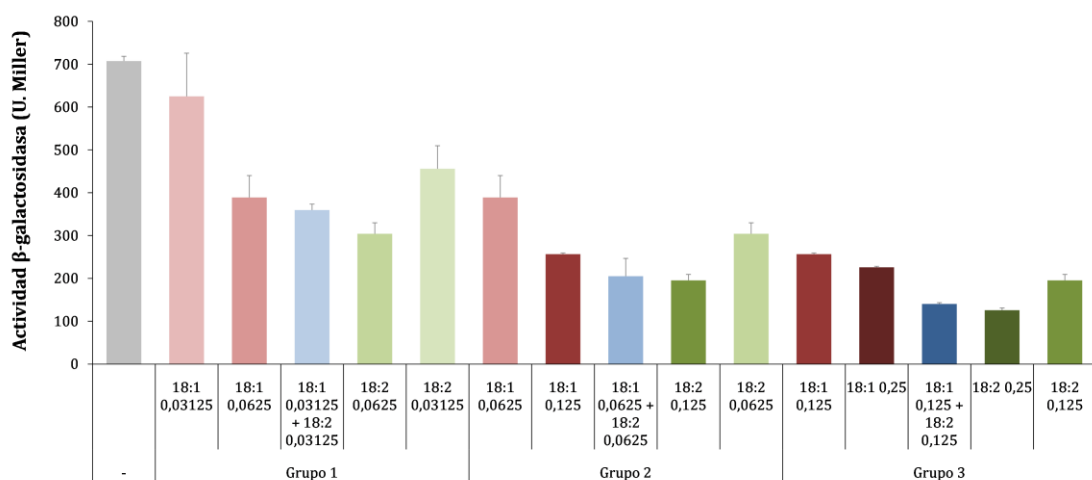


FIGURA R&D.I.12: Efecto combinado de los LCUFAs sobre el sistema PhoP/PhoQ. La actividad β-galactosidasa de la fusión transcripcional *virK::lacZ* fue medida a partir de células crecidas toda la noche en medio de cultivo LB suplementado con las cantidades indicadas (en concentración final en mg/ml) de ácido oleico (18:1) o de ácido linoleico (18:2), solos o en combinación. Las barras en distintas tonalidades corresponden a las condiciones de agregado al medio de cultivo LB de 18:1 solo (rojo), 18:2 solo (verde) o una combinación de ambos (azul). Los resultados corresponden al promedio de dos ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En todas las condiciones combinadas ensayadas (barras centrales azules), los resultados muestran, comparando con la condición con agregado sólo de C18:1 o C18:2 a igual concentración que en la combinatoria (barras rojas y verdes en los extremos de cada grupo), que el agregado de otro ácido graso insaturado aumenta el efecto inhibitorio sobre la expresión de *virK* respecto al ejercido por cada uno de manera individual. A modo de realizar un análisis cuantitativo de la contribución de cada uno de los ácidos grasos insaturados en la mezcla, se calcularon los aportes

porcentuales de cada uno en la condición combinada, tomando como 100% el nivel de expresión de *virK* en presencia del otro ácido graso presente en forma individual en la concentración utilizada en la combinatoria. Por ejemplo, para analizar el aporte de C18:2 en la combinatoria del grupo 1, se tomó como valor de 100% la medida de actividad β -galactosidasa de la condición con agregado de C18:1 a concentración final 0,03125 mg/ml en el medio de cultivo (y a la inversa para el cálculo del aporte de C18:1 en la mezcla combinatoria). De esta manera, se pudo determinar que el aporte de C18:1 y C18:2 en la condición en que se encuentran combinados es de: 21 y 42%, 33 y 47%, y 28 y 45%, para los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. Estos resultados permiten establecer que existe un efecto conjunto cuando dos ácidos grasos insaturados están presentes en el medio de crecimiento bacteriano que es mayor que el de cada uno actuando individualmente. Por otra parte, se puede observar en todos los casos que el aporte debido a la presencia del ácido linoleico (C18:2) es mayor que el dado por el ácido oleico (C18:1), lo que se condice con lo observado en las curvas de inhibición de los ácidos grasos en forma individual, donde C18:2 posee un mayor efecto inhibitorio sobre el sistema PhoP/PhoQ en todo el rango de concentraciones ensayadas. Este mayor efecto inhibitorio por parte de C18:2 sobre la expresión de genes del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ puede ser debido a que este ácido graso, en caso de actuar como ligando sobre la proteína sensora, se ajuste mejor en la estructura tridimensional de PhoQ, o a que perturba de manera más pronunciada el entorno en el cuál la proteína se encuentra anclada, lo que se traduce en mayor efecto inhibitorio de su actividad autoquinasa.

4. c. Efecto debido a componentes presentes en bilis fisiológica fresca

Como se mencionó en la introducción, la bilis es un fluido, producido por el hígado, que ayuda en la digestión de los lípidos en el intestino delgado. En muchas especies, la bilis es almacenada en la vesícula y, cuando el organismo ingiere alimento, es liberada al duodeno. La bilis está compuesta por 85% de agua, 10% de sales biliares, 3% de moco y pigmentos, 1% de grasas, y 0,7% de sales inorgánicas.

Un reporte previo indicó que la bilis fisiológica fresca bovina y murina es capaz de reprimir la expresión del gen *phoP* y otros genes PhoP-regulados, y que esta inhibición es independiente del sensado por parte del sistema PhoP/PhoQ. Además, se afirma que la inhibición no es debida a los ácidos biliares (componentes

mayoritarios de la misma) sino a pequeñas moléculas con propiedades hidrofóbicas que no pudieron ser identificadas (253). Teniendo en cuenta este antecedente, decidimos estudiar este efecto utilizando nuestros genes reporteros dependientes e independientes del sistema PhoP/PhoQ.

Para ello, las cepas conteniendo las fusiones transcripcionales *virK::lacZ* y *tppB::lacZ* se inocularon en medio de crecimiento LB con agregado de distintos porcentajes finales de bilis fresca obtenida a partir de ratas macho Wistar, y se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. Como se mencionó previamente, la bilis favorece la digestión de los alimentos debido a su actividad emulsionante sobre los ácidos grasos presentes en los mismos. Por ello, es posible que a ciertas concentraciones pueda actuar como detergente sobre las membranas bacterianas, afectando de esta manera la estructura celular y finalmente el crecimiento. Como se pudo verificar mediante medidas de DO_{600nm} sobre los cultivos crecidos hasta fase estacionaria en las diferentes condiciones, la bilis no afectó el crecimiento celular en el rango de concentraciones ensayadas; más aún, a las concentraciones más elevadas promovió ligeramente el crecimiento bacteriano. Luego, estos cultivos se utilizaron para evaluar la actividad transcripcional de los genes reporteros mediante medidas de actividad β-galactosidasa.

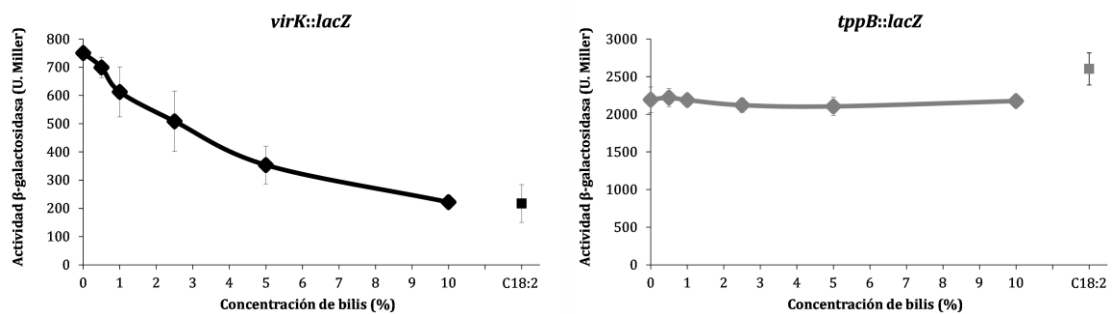


FIGURA R&D.I.13: Inhibición específica del sistema PhoP/PhoQ debida a componentes presentes en bilis fresca. La actividad β-galactosidasa de las fusiones transcripcionales *virK::lacZ* (izquierda) y *tppB::lacZ* (derecha) fue medida a partir de células crecidas toda la noche en medio de cultivo LB con agregado de las cantidades indicadas de bilis fresca (en porcentaje final) o con ácido linoleico 0,5 mg/ml (C18:2). Los resultados corresponden al promedio de dos ensayos independientes realizados por duplicado a partir de dos muestras diferentes de bilis fresca, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Del análisis de la figura R&D.I.13 se desprende que el agregado de cantidades crecientes de bilis fresca al medio de cultivo de las cepas inhibe la expresión del gen reportero dependiente de PhoP, mientras que no afecta la actividad transcripcional

del reportero control, en el rango de concentraciones ensayadas. Como control del ensayo, se puede observar la inhibición específica sobre el sistema PhoP/PhoQ por parte del ácido linoleico (figura R&D.I.13, C18:2), como se describió previamente. Se puede establecer que aproximadamente un 5% de bilis fresca presente en el medio de cultivo produce una inhibición del 50% sobre la actividad del gen PhoP-regulado. Además, es apreciable que un 10% de bilis presente en el medio de crecimiento ejerce un nivel de represión equiparable al obtenido cuando el mismo medio de crecimiento es suplementado con una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de C18:2.

Se ha informado que en bilis de ratas la concentración total de ácidos grasos libres es de 74,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (254). Además, se han determinado los principales ácidos grasos presentes, mostrándose la composición aproximada en porcentaje y concentración en la tabla R&D.I.1. Es importante mencionar que la composición de la bilis se ve afectada por la dieta y el estado nutricional y de salud de los animales, pudiendo estos valores variar significativamente entre sujetos.

ÁCIDO GRASO		ABUNDANCIA	CONCENTRACIÓN
Nombre	Nomenclatura	%	$\mu\text{g}/\text{ml}$
Laurico	12:0	24	17,8
Palmítico	16:0	20,8	15,4
Linoleico	18:2	12,4	9,2
Oleico	18:1	10,8	8,0
Esteárico	18:0	10,4	7,7
Palmitoleico	16:1	9,4	7,0
Linolénico	18:3	5,6	4,1
Araquidónico	20:4	5	3,7
Mirístico	14:0	1,6	1,2
Total		100	74,1

Tabla R&D.I.1. *Composición de bilis fisiológica de rata*

Esta información permite calcular que existe una concentración aproximada de 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácidos grasos insaturados en la bilis de rata, representando un 38% del contenido total de ácidos grasos libres de la misma. Si tomamos en cuenta que un 10% de bilis, que correspondería a una concentración de 2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácidos grasos insaturados, ejerce un efecto represor equiparable al que produce una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido linoleico (figura R&D.I.13), es posible hipotetizar que pueda existir un efecto aditivo o sinérgico debido a la presencia de dos o más ácidos grasos

insaturados en forma simultánea, a la existencia de otros compuestos que actúen en conjunto con los LCUFAs, o a la ocurrencia en la bilis de otros compuestos que ejerzan un efecto inhibitorio sobre el sistema y que no hayan sido identificados.

En cuanto al primer punto, demostramos que la presencia de dos ácidos grasos insaturados en el medio de crecimiento bacteriano ejerce un efecto represor sobre el sistema PhoP/PhoQ que es mayor que el observado para cada compuesto de manera individual. Por otra parte, cabe recordar que la bilis contiene sales inorgánicas, por lo que es posible que existan concentraciones represoras de cationes divalentes (como Ca^{2+} y Mg^{2+}) y que el efecto observado sobre el sistema en estudio sea debido a la presencia de los mismos, o que la inhibición del TCS sea por acción del efecto combinado entre el catión Mg^{2+} y los LCUFAs, como previamente se ha determinado por la Dra. Mariela Sciara en su tesis doctoral (184).

Al momento de la escritura de este trabajo de tesis no fue posible determinar las especies presentes en las muestras de bilis que son responsables del efecto inhibitorio observado. Es por ello que queda planteado la realización a futuro de ensayos de cromatografía en capa delgada para separar los componentes de la bilis, seguido de bioautografía con nuestra cepa reportera del sistema PhoP/PhoQ, como previamente hemos descrito (187). En estas corridas cromatográficas, los cationes divalentes quedan retenidos en el punto de siembra, lo que permitirá su separación de otras especies presentes en la muestra. La posterior identificación de estas especies será llevada a cabo mediante análisis por GC-MS de los spots inhibitorios. De manera adicional, también se realizará este ensayo a partir de las muestras obtenidas luego del fraccionamiento de la bilis. Por otro lado, como se describió previamente, los ácidos grasos insaturados ejercen su acción represora sobre el regulón PhoP mediante la inhibición de la actividad de autofosforilación de la proteína PhoQ. Por lo tanto, es de nuestro interés realizar preparaciones de membrana interna enriquecida en la proteína sensora a partir de células crecidas en presencia de bilis fresca, para utilizarlas en el ensayo de actividad autoquinasa y establecer si el blanco de acción es el mismo que el identificado oportunamente para los LCUFAs.

R&D. I. 5. Conclusiones finales

El sistema regulatorio PhoP/PhoQ es fundamental en la virulencia de *Salmonella*

Typhimurium. El hecho de que PhoP/PhoQ pertenezca a los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS), que están ausentes en organismos mamíferos, lo hace un blanco ideal para el desarrollo de estrategias antimicrobianas. Previamente, como parte de la tesis de la Dra. Mariela Sciara, durante la búsqueda de compuestos de origen natural que pudieran modular la actividad del TCS PhoP/PhoQ de *Salmonella*, se encontró que los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFAs) eran capaces de reprimir la actividad del sistema de transducción de señales. La acción de estos compuestos fue detectada cuando las bacterias eran crecidas en presencia de concentraciones subinhibitorias de ácidos grasos insaturados de 16 o 18 átomos de carbono de longitud de origen comercial. Se demostró que los LCUFAs específicamente inhiben el sistema PhoP/PhoQ porque reprimen la expresión tanto del operon *phoPQ* como de los genes PhoP-activados a nivel transcripcional, mientras que no ejercen efecto sobre genes controlados por otros mecanismos de transducción de señales. Más aún, ácidos grasos saturados de misma longitud de cadena carbonada ensayados a concentraciones equivalentes a las empleadas para los LCUFAs no alteraron la expresión de genes dependientes de PhoP.

Como parte de este trabajo de tesis, se determinó en primer lugar que cuando los ácidos grasos insaturados son agregados al medio de crecimiento bacteriano, a la concentración que produce máximos niveles de represión de la expresión de los genes regulados por PhoP, no afectan el crecimiento de *Salmonella*, así como también que la integridad del sistema PhoP/PhoQ no presenta ventajas adaptativas frente al crecimiento en estas condiciones.

Por otra parte, se estableció que la represión de la actividad del sistema mediada por LCUFAs es debida a que los mismos inhiben específicamente, y en una manera dosis-dependiente, la actividad de autofosforilación (autoquinasa) de la proteína sensora PhoQ, mientras que no se detectó efecto cuando se ensayaron ácidos grasos saturados de igual longitud de cadena carbonada. Como control, no se apreció efecto por parte de ninguno de los ácidos grasos (saturados o insaturados) sobre la actividad autoquinasa de la proteína sensora EnvZ, que es funcional y estructuralmente similar a PhoQ, descartando un posible efecto sobre el dominio catalítico de las histidina-quinazas de Clase 1 (de acuerdo a la clasificación en la referencia (77)).

Previamente se ha reportado que concentraciones milimolares de Mg^{2+}

reprimen el operon *phoPQ* por inducción de la actividad fosfatasa de PhoQ (98), y en este trabajo de tesis demostramos que el catión divalente no interfiere con la acción represora del ácido linoleico sobre los niveles de actividad autoquinasa de PhoQ, aportando más evidencias que apoyan la hipótesis de que ambos ejercen diferentes señalizaciones sobre la proteína sensora y actúan en conjunto para disminuir la expresión de los genes regulados por PhoP.

Los ácidos grasos exógenos pueden ser incorporados y metabolizados a través de la vía de β -oxidación en *Salmonella*. Mediante medidas de actividad transcripcional y por ensayos de actividad autoquinasa sobre mutantes en distintas enzimas de esta vía, determinamos que la integridad de esta ruta metabólica no es necesaria para que los ácidos grasos insaturados ejerzan su efecto represor, descartando que la acción sobre el sistema sea resultado de un incremento en la concentración intracelular de intermediarios de la β -oxidación, en la concentración de acetil-CoA (el producto final de la misma) o al aumento cuantitativamente significativo de la incorporación de LCUFAs a los fosfolípidos de membrana por la vía PlsB/PlsC, no pudiéndose descartar que la incorporación se produzca por la vía de la 2-acil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina aciltransferasa/acil-ACP sintetasa (que incorpora de modo preferencial ácidos grasos saturados) o por mecanismos que no se conocen hasta el momento.

Los resultados obtenidos permiten establecer que los ácidos grasos insaturados de cadena larga, sin mediar procesos metabólicos que requieren de la integridad de la célula bacteriana, actuarían interactuando con PhoQ e inhibiendo su actividad autoquinasa, y de esta manera la expresión del regulón PhoP y otros genes regulados por este sistema de dos componentes. En esta dirección, resta definir si los LCUFAs actúan como ligandos de la proteína sensora, y en este caso el sitio de unión específico en la misma, o si actúan modulando propiedades biofísicas de la envoltura bacteriana que son transmitidas a la estructura de la proteína PhoQ.

Finalmente, los ácidos grasos insaturados libres están presentes en nichos ambientales que *Salmonella* tiene que atravesar a lo largo del proceso infeccioso del hospedador. Los LCUFAs están presentes en el tracto digestivo, formando parte de los componentes de la bilis, en el contenido ruminal y en el intestino de los mamíferos debido a la degradación de los nutrientes por parte de las enzimas lipolíticas. Existen pocos reportes acerca de los niveles cuantitativos del contenido de LCUFAs en fluidos fisiológicos, y la mayoría los expresa como porcentaje relativo al contenido total de

lípidos (254), por lo que es difícil realizar una extrapolación de los resultados obtenidos en este trabajo con lo que ocurriría a nivel del hospedador. Además, estos valores varían dependiendo de la dieta, y del estado metabólico y de salud de los organismos.

En una aproximación a estos escenarios fisiológicos, también evaluamos la respuesta del sistema PhoP/PhoQ frente a la acción de bilis murina fresca, pudiendo observar una inhibición dosis-dependiente específica de la expresión del gen reportero PhoP-regulado. Teniendo en cuenta los porcentajes reportados de ácidos grasos insaturados presentes en bilis murina (254), calculamos estimativamente que los mismos se encuentran en concentración de un orden de magnitud menor que la utilizada en nuestros experimentos, por lo que el efecto ejercido por la muestra de bilis murina no sería debido a estas especies, al menos de modo exclusivo. Sin embargo, en este fluido fisiológico se encuentran presentes diversos ácidos grasos insaturados así como también otros compuestos, como cationes divalentes, que podrían estar actuando en conjunto y ejerciendo un efecto represor mayor que el observado para cada uno de manera individual. En este sentido, también ensayamos la respuesta del sistema frente a mezclas combinatorias de los ácidos grasos oleico y linoleico, estableciendo que la presencia en simultáneo de ambos produce un efecto inhibitorio mayor que el observado para cada uno de manera individual, lo que aporta consistencia a esta hipótesis.

Hasta el momento, el catión Mg^{2+} , los péptidos catiónicos microbicidas (CAMPs) y el pH ácido son las señales descritas como moduladores fisiológicamente relevantes del sistema PhoP/PhoQ en el hospedador mamífero. Nuestros resultados permiten afirmar la existencia de nuevos compuestos que actúan como señales de este sistema de dos componentes: los ácidos grasos insaturados de cadena larga. Estos ácidos grasos, que en el curso de su ciclo infectivo la bacteria encontraría tanto en el contenido gástrico como en plasma sanguíneo del hospedador mamífero, están involucrados en la modulación del regulón de virulencia PhoP/PhoQ, poniendo de manifiesto un grado de complejidad adicional en el mecanismo regulatorio del sistema.

Nuestras conclusiones, junto con datos previos, nos permiten especular que la presencia de LCUFAs, como el ácido linoleico, puede servir como señal que, en combinación con los cationes divalentes, contribuye para que *Salmonella* distinga

entre los ambientes extracelular e intracelular. En respuesta a estas señales, el sistema PhoP/PhoQ permanecería inactivo. Una vez en el ambiente intravacuolar de la célula hospedadora, la ausencia de estas señales represoras junto con la presencia de condiciones activadoras, como el pH ácido y la presencia de péptidos catiónicos microbicidas, activaría el sistema. Esto permitiría a la bacteria inducir la expresión de factores de virulencia que contrarresten los mecanismos de defensa de la célula infectada, favoreciendo la sobrevivencia y la diseminación bacteriana.

Por último, el conocimiento del mecanismo de acción a nivel molecular posee potencialidad de aplicación profiláctica o terapéutica en el diseño de moléculas sintéticas con base en esta molécula de origen natural, y para un rastreo orientado de compuestos estructuralmente relacionados con acción farmacológica.

CAPÍTULO II

**Búsqueda de nuevos genes regulados
por el sistema PhoP/PhoQ
mediante ensayos de microarreglos**

Los *arrays* de ácidos nucleicos, o simplemente los *arrays* de ADN, son un grupo de tecnologías en las cuales secuencias específicas de ADN (sondas) son depositadas o sintetizadas sobre una superficie en una matriz de dos dimensiones, de manera que el ADN es unido de forma covalente o no covalente en un punto de la superficie. Generalizando a un gran número de puntos de ADN, un *array* puede ser usado para cuantificar una gran variedad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos en solución. Típicamente, un *array* de ADN es usado para probar una solución de una mezcla de ácidos nucleicos marcados, y la unión (por hibridación) de estos “blancos” a las sondas en el *array* es usada para medir la concentración relativa de las especies de ácidos nucleicos en la solución (255). La anotación de las secuencias genómicas de diversos organismos ha sido usada para construir *microarrays* (microarreglos) conteniendo la mayoría o todos los genes predichos en un genoma (256).

La principal aplicación de los microarreglos de ADN es determinar los niveles de expresión génica. Para ello, el ARN es extraído de las células de interés, para luego ser tanto marcado directamente, o convertido a un ADNc marcado, o convertido a un ADNc unido al promotor de la T7 polimerasa el cuál es luego convertido a ARNc mediante el proceso de amplificación de Eberwine. El ADNc o ARNc marcado es luego hibridado a las sondas presentes en el microarreglo, el mismo es lavado para eliminar las interacciones inespecíficas y la señal detectada por medición de la fluorescencia en cada punto. La fluorescencia inducida por láser generalmente es medida con un microscopio confocal. La intensidad de la(s) señal(es) en cada punto es tomada como una medida del nivel de expresión del correspondiente gen (255).

Por ejemplo, en un microarreglo de dos colores, los transcritos extraídos de dos condiciones diferentes son marcados con compuestos fluorescentes distintos mientras se convierten a ADNc. Estas muestras marcadas son luego hibridadas a la sonda complementaria inmovilizada en el *array*. La abundancia relativa de cada transcritos en las dos condiciones diferenciales puede ser determinada mediante la medición de la intensidad de luz de los distintos fluoróforos (257).

Como parte del trabajo efectuado en el marco del convenio de cooperación bilateral del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica MINCyT-MICINN (Ministerios de Ciencia de Argentina y España, respectivamente), se prepararon muestras de ARN de cepas de *S. Typhimurium* 14028s salvaje y *phoP* crecidas en ausencia y presencia de ácido linoleico, y se utilizaron las mismas para llevar a cabo

ensayos de microarreglos. Estos protocolos fueron realizados en el Laboratorio de Patógenos Bacterianos Intracelulares (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid), que se encuentra bajo la dirección del Dr. Francisco García-del Portillo.

R&D. II. 1. Obtención de muestras de ARN y realización de ensayos de microarreglos

Las muestras de ARN de las cepas de *S. Typhimurium* salvaje y *phoP* crecidas en medio de cultivo LB en ausencia o presencia de ácido linoleico fueron obtenidas como se detalla en la sección M&M.20.a. Luego de realizar el control de la concentración y la calidad de las mismas, se determinó que eran aptas para realizar los ensayos de microarreglos, labor que fue llevada a cabo por el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, <http://www.cnb.csic.es/index.php/es/servicios/genomica.html>).

El Servicio de Genómica nos proporcionó los resultados como relación entre dos condiciones dadas, a saber: *phoP*⁺/*phoP*⁻, *phoP*⁺/*wt*⁺, *phoP*⁻/*wt*⁻, y *wt*⁺/*wt*⁻; donde “*wt*” y “*phoP*” denotan las cepas de *Salmonella* salvaje o mutante en el regulador de respuesta PhoP, y los signos “-” y “+” denotan la ausencia o presencia de C18:2 en el medio de crecimiento, respectivamente. Estos datos fueron analizados con el programa FIESTA (232), que mediante la aplicación de filtros permite obtener información respecto de los genes activados o reprimidos en cada una de las relaciones arriba mencionadas. Finalmente, se utilizó el programa VENNY (233) para realizar las combinaciones adecuadas entre estos resultados obtenidos, y extraer datos a partir de las intersecciones o exclusiones entre los conjuntos formados.

En primer lugar, a partir de los datos del conjunto *phoP*⁻/*wt*⁻ se aplicó un filtro para obtener como resultado el conjunto de genes que estuvieran activados por el regulador transcripcional. A partir de esta lista fue posible verificar la existencia de un gran número de genes previamente reportados como activados por PhoP, como por ejemplo *virK*, *phoP*, *pmrD*, *pagC*, *mig-14* y *pipD*, entre otros, lo que constituyó una validación interna del experimento realizado.

R&D. II. 2. Análisis de los resultados del ensayo de microarreglos: conjunto de genes reprimidos por ácido linoleico de manera dependiente de PhoP

En una primera aproximación, de las diversas combinaciones posibles, nos focalizamos en los resultados correspondientes a genes activados por PhoP que además fueran reprimidos por ácido linoleico de manera PhoP-dependiente. Para ello, se utilizaron los resultados de la relación wt+/wt- (es decir aquellos regulados por C18:2 en la cepa salvaje) y de la relación *phoP*+/*phoP*- (aquellos regulados por C18:2, PhoP-independientes). Utilizando el programa FIESTA se estableció como filtro un valor de $\log\text{Ratio}(M) < -0,5$ (que representa el logaritmo de la expresión diferencial de cada gen entre ambas condiciones: $\log_2 \frac{\text{condic. 1}}{\text{condic. 2}}$), de manera de obtener los genes regulados por C18:2 cuya expresión estuviera disminuida en presencia del ácido graso respecto a la condición sin agregado del mismo. Además, se estableció como filtro que al menos 2 sondas ($N \geq 2$) correspondientes al mismo gen presenten un valor de M menor a -0,5. Luego, con la lista de los elementos reprimidos por ácido linoleico en las cepas salvaje y *phoP*, se realizó el diagrama de Venn correspondiente, que puede observarse en la figura R&D.II.1.

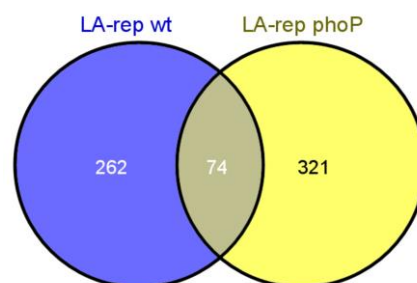


FIGURA R&D.II.1: Diagrama de Venn. El conjunto en azul (izquierda) representa los genes reprimidos por C18:2 en la cepa salvaje (wt), mientras que los del conjunto amarillo (derecha) son aquellos reprimidos por el ácido graso en una cepa *phoP*. Aquellos elementos reprimidos por ácido linoleico dependientes de PhoP son los presentes en el conjunto excluido de la izquierda (262).

Para obtener los genes de nuestro interés (reprimidos por C18:2, PhoP-dependientes), fue necesario tomar aquellos reprimidos por el ácido graso en la cepa salvaje y descartar aquellos que también son reprimidos por este compuesto de manera independiente de PhoP, lo cual corresponde al conjunto excluido a la izquierda del diagrama de Venn. Este grupo contiene 262 elementos, pero dado que algunos de ellos son controles internos del ensayo de microarreglos, finalmente se

obtuvo una lista de 213 elementos correspondientes a genes conocidos o putativos, algunos de los cuales ya fueron caracterizados previamente como parte del regulón PhoP, y otros que son posibles nuevos candidatos a ser regulados por este factor de transcripción. En primer lugar en este grupo aparece el gen *pagC*, ya reportado como gen regulado por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. A continuación en la lista aparecen diversos genes involucrados en un mismo proceso celular o metabólico, como por ejemplo: metabolismo central del carbono (*acs*, *fdhF*, *manX*, *manZ*, *aceF*, *glgC*, *glgP*, *glgX*, *tktB*, *oadB*, *frwC*, *pflB*, *celB*, *icdA*, *dgoA*, *edd*, *ybhE*, *fruF*, *mtlD*, *pykA*, *mdh*, *rbsB*, *malT*, entre otros); metabolismo de diversos aminoácidos, particularmente arginina, glutamato y aspartato (*astA*, *argD*, *astD*, *gltJ*, *astB*, *gltK*, *argT*); metabolismo de poliaminas, como putrescina y espermidina (*gabT*, *gabD*, *gabP*, *potF*, *potH*, *gsp*); segregación del cromosoma, formación del septo y división celular (*minE*, *ftsW*, *ftsL*, *ftsK*, *ftsI*, *mukB*, *mukE*, *minD*, *ftsE*, *ftsZ*); síntesis de pared celular (*mraW*, *mraY*, *mraZ*, *murG*, *dacC*, *yebA?*); biosíntesis y modificación de LPS, y biosíntesis de glicerofosfolípidos (*rfbI*, *rfbX*, *rfbA*, *ygiH*, *rfbC*, *ushB*, *lpxA*, *rlpB*, *pmrF*); biosíntesis de ácido colánico (*wcaL*); regulación de la proteasa FtsH (*hflC*, *hflK*); sistema de sensado de la densidad de población celular o *quorum sensing* (*ydeZ*, *yneA*, *yneC*, *ydeY*, *ego*, *ydeV*); formación del ribosoma (*rpsO*, *rplA*, *rpsQ*, *rpsK*, *rpmB*, *rplF*, *rplO*); cadena de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa (*cyoE*, *cyoC*, *nuoL*, *cyoD*, *atpC*, *sdhA*); homeostasis de Mg^{2+} (*mgtB*, *mgtC*); entre otros.

Dada la multiplicidad de procesos que se mostraron afectados en nuestro análisis, se decidió seleccionar algunos de ellos para continuar con la búsqueda de nuevos genes regulados por el regulador de respuesta PhoP. Fue de nuestro interés continuar el estudio sobre los genes involucrados en el metabolismo de arginina, glutamato y aspartato, en el metabolismo de putrescina y espermidina, y en el mecanismo de sensado de la densidad de población celular (*quorum sensing*). En la tabla R&D.II.1 se detallan estos elementos, se menciona la función de la proteína codificada por los mismos y el proceso metabólico o celular en el que participa. Además, se indican los valores de M obtenidos al buscar cada gen en los conjuntos de datos *phoP*-/*wt*- (genes cuya expresión es modulada por el regulador PhoP) y *wt*+/*wt*- (genes cuya expresión es regulada por ácido linoleico).

Pos.	Sonda	Proteína codificada	Proceso metabólico / celular	Anotación COG	Valor M			
					phoP ⁻ /wt ⁻		wt ⁺ /wt ⁻	
1	<i>pagC</i>	Proteína de membrana implicada en virulencia	Sobrevida en macrófagos	Virulencia	-3,42	-2,36	-3,07	-2,32
9	<i>astA</i>	Arginina succiniltransferasa	Catabolismo de arginina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	0,08	0,09	0,20	-2,60 -2,52 -2,15
12	<i>ydeZ</i>	LsrD, proteína canal de membrana	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-1,37	-1,30	-1,08	-2,45 -1,96 -1,36
20	<i>yneA</i>	LsrB, proteína periplásmica de unión a AI-2	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-1,65	-1,44	-1,27	-2,32 -1,52 -1,36
32	<i>gabT</i>	γ-aminobutirato aminotransferasa	Catabolismo de putrescina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,84	-1,77	-1,27	-2,18 -1,87 -1,54
34	<i>yneC</i>	LsrG, proteína degradadora de AI-2	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-1,49	-1,47	-1,34	-2,17 -2,15 -1,64
55	<i>ydeY</i>	LsrC, proteína canal de membrana	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-2,69	-2,58	-1,69	-1,97 -1,86 -1,73
73	<i>astD</i>	N-succinilglutámico 5-semialdehído deshidrogenasa	Catabolismo de arginina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,39	-1,08	-1,07	-1,89 -1,67 -1,45
74	<i>gabD</i>	Succinato semialdehído deshidrogenasa I	Catabolismo de putrescina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-3,61	-3,25	-2,45	-1,90 -1,85 -1,34
77	<i>ego</i>	LsrA, proteína de unión a ATP	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-2,04	-1,63	-1,23	-1,88 -1,44 -1,43
81	<i>glfJ</i>	Proteína transportadora de glutamato/aspartato	Sistema de transporte ABC, transporte de glutamato/aspartato	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,78	-1,59		-1,86 -1,63
86	<i>astB</i>	Succinilarginina dehidrolasa	Catabolismo de arginina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,92	-1,46	-1,34	-1,83 -1,56 -1,30
100	<i>crp</i>	Regulador transcripcional global activado por AMPc	Transcripción de operones sensibles a catabolitos	Transducción de señales	-1,19	-1,18		-1,81 -1,52
113	<i>glfK</i>	Proteína transportadora de glutamato/aspartato	Sistema de transporte ABC, transporte de glutamato/aspartato	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,83	-1,55	-1,08	-1,74 -1,72 -1,20
119	<i>gabP</i>	Proteína de transporte de GABA dependiente de RpoS	Catabolismo de putrescina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-2,25	-1,74	-1,68	-1,71 -1,51 -1,31
159	<i>argT</i>	Proteína periplásmica de unión a lisina-arginina-ornitina	Sistema de transporte ABC, transporte de lisina-arginina-ornitina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-1,87	-1,69		-1,60 -1,56
163	<i>potF</i>	Proteína periplásmica de unión a putrescina	Sistema de transporte ABC, transporte de putrescina	Metabolismo y transporte de metabolitos secund.	-2,25	-2,13	-1,94	-1,60 -1,59 -1,25
168	<i>ydeV</i>	LsrK, kinasa de AI-2	Sistema de transporte ABC, transporte de autoinductor-2 (AI-2)	Quorum sensing	-2,58	-1,66	-1,29	-1,60 -1,49 -1,41
186	<i>gsp</i>	Prot. bifuncional glutationilperimidina amidasa / glutationilperimidina sintetasa	Metabolismo de glutación	Metabolismo y transporte de metabolitos secund.	-1,52	-1,51	-1,10	-1,55 -1,48 -1,43
198	<i>potH</i>	Proteína integral de membrana transportadora de putrescina	Sistema de transporte ABC, transporte de putrescina	Metabolismo y transporte de metabolitos secund.	-1,80	-1,73	-1,50	-1,51 -1,45 -1,44

TABLA R&D.II.1: Elementos presentes en el conjunto de resultados PhoP-activados reprimidos por C18:2. Sólo se indican aquellos genes que fueron analizados posteriormente. Las columnas indican: Pos., posición en la lista completa obtenida; Sonda, nombre de la sonda en el ensayo de microarreglos; Anotación COG, clasificación según *Clusters of Orthologous Groups of proteins* (331); Valor M, valores M obtenidos al buscar la respectiva sonda en los conjuntos de datos *phoP⁻/wt⁻* y *wt⁺/wt⁻*.

R&D. II. 3. Identificación de genes candidatos potenciales bajo regulación del factor de transcripción PhoP

A partir de la lista de genes que se encontraron modificados en los procesos previamente detallados, se realizó un análisis bioinformático utilizando los servidores MEME/MAST (235, 236, 258) para determinar si existían posibles cajas de unión a PhoP en las regiones promotoras de aquellos genes no conocidos como PhoP-regulados.

Para lograr este objetivo, se procedió según lo descrito en la sección M&M.21. Primero, se obtuvo la matriz de probabilidades resultante del análisis de la región promotora de 33 genes PhoP-regulados mediante el servidor MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*), la cual se muestra en la figura R&D.II.2.

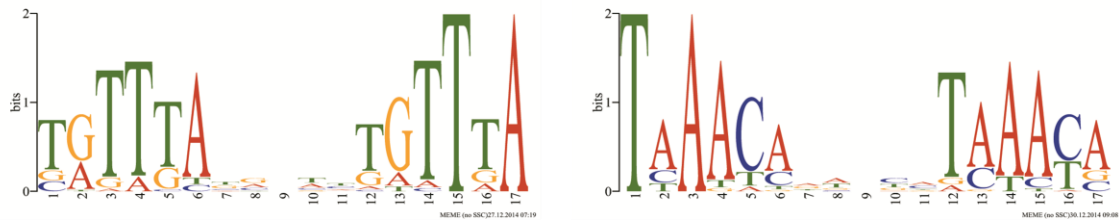


FIGURA R&D.II.2: *Matriz probabilidad de los sitios consenso de unión de PhoP.* Obtenida mediante el servidor MEME, utilizando como entrada las regiones promotoras de 33 genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ. A la izquierda se muestra la secuencia consenso correspondiente a la hebra positiva, mientras que a la derecha se muestra la correspondiente a la hebra complementaria invertida.

Posteriormente, esta matriz de probabilidades fue utilizada para buscar posibles sitios de unión a PhoP en las regiones promotoras de los genes previamente seleccionados a partir del ensayo de microarreglos. Con este fin, se tomaron del genoma de *Salmonella* Typhimurium 14028s las regiones codificantes de cada gen u operón flanqueadas por 300 pb corriente arriba y 300 pb corriente abajo, y se analizaron utilizando el servidor MAST (*Motif Alignment and Search Tool*) aplicando como matriz la obtenida previamente en el servidor MEME (figura R&D.II.2). En primera instancia, se analizaron los genes *argD*, *argT* y *gsp*; y los operones *astCADBE*, *glt* (*gltI-sroC-gltJKL-rihA-STM14_0768*), *gabDTP*, *potFGHI* y *lsr* (*ego-ydeYZ-yneABC-STM14_4905*).

A continuación, se describirán de manera más detallada los procesos metabólicos y celulares, con los resultados obtenidos en la búsqueda de cajas de unión a PhoP en los genes y operones anteriormente mencionados.

3. a. Metabolismo de arginina, glutamato y aspartato

En los resultados del ensayo de microarreglos, se observó que numerosos genes que codifican enzimas de las vías de metabolismo de aminoácidos se encontraban afectados. En este sentido, fue consistente el hecho de que se encontrara reprimida la expresión, en presencia de C18:2 de manera PhoP-dependiente, de varios genes del operón *ast* y del operón *glt*, así como también la expresión de los genes *argD* y *argT*. A continuación, se describe el metabolismo de aminoácidos, y la función y regulación de los genes y operones recién mencionados.

El glutamato y la glutamina son los mayores donantes intracelulares de nitrógeno, aportando 75% y 25% del nitrógeno celular, respectivamente (259). Por lo tanto, la asimilación de nitrógeno debe resultar en la síntesis de estos dos donantes de nitrógeno. El amonio puede ser considerado la fuente externa de asimilación de nitrógeno. Hay dos rutas para la fijación del amonio extracelular: en la primera, la glutamato deshidrogenasa asimila amonio y sintetiza glutamato a partir de α -cetoglutarato; mientras que en la segunda, la glutamina sintetasa asimila amonio y genera glutamina, la cual puede ser luego transformada en glutamato por la glutamato sintasa. La primera vía se asocia con la presencia de amonio y no consume ATP, en tanto la segunda está asociada con bajos niveles de amonio o crecimiento en otras fuentes de nitrógeno y requiere ATP para su funcionamiento. Por lo tanto, la primera de las vías es fisiológicamente ventajosa en presencia de carbono y energía limitantes, mientras que la segunda es utilizada cuando hay energía disponible (259). Por otra parte, en ausencia de amonio, *E. coli* y organismos relacionados, pueden utilizar un número reducido de fuentes de nitrógeno, como aminoácidos, nucleósidos, bases nitrogenadas, etc. El catabolismo de estas fuentes alternativas de nitrógeno puede producir amonio para la síntesis de glutamina, uno de los donantes intracelulares de nitrógeno. Esta respuesta coordinada a la limitación de nitrógeno se denomina respuesta regulada por nitrógeno (Ntr) (259). La mayoría de los genes regulados por esta respuesta codifican proteínas de transporte: *amtB* (amonio), *argT-hisJMPQ* (arginina, lisina, ornitina e histidina), *codB* (citosina), *cycA* (D-alanina, D-serina, y glicina), *ddpXABCDE* (D-alanil-D-alanina), *dppABCDE* (dipéptidos), *gabP* (GABA), *glnHPQ* (glutamina), *gltIJKL* (glutamato-aspartato), *nupC* (nucleósidos), *oppABCD* (oligopéptidos), *potFGHI* (putrescina), entre otros. En otras palabras, existen sistemas de transporte Ntr-dependientes solo para aquellos aminoácidos que pueden rápidamente proveer nitrógeno para la síntesis de glutamato y glutamina (260). En resumen, el patrón de expresión génica de la respuesta Ntr promueve la asimilación de amonio, la degradación de nitrógeno y el aumento de los niveles de poliaminas (como por ejemplo putrescina) (261).

El operón *ast* codifica para las enzimas de la vía de la arginina succiniltransferasa (AST), encargadas del catabolismo de arginina en condiciones aeróbicas (figura R&D.II.3) (262). Esta vía es requerida para el crecimiento con arginina como la única fuente de nitrógeno. Su expresión es moderada durante la

limitación general de nitrógeno, y máxima en presencia de arginina. Además, el operón *ast* se encuentra inducido en fase estacionaria de crecimiento (263, 264).

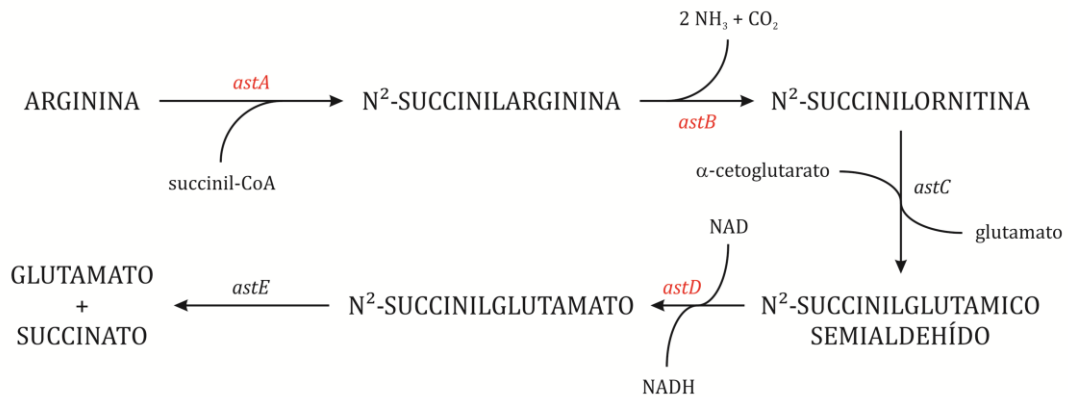


FIGURA R&D.II.3: Vía de la arginina succiniltransferasa (AST). Los genes indicados codifican para las enzimas: *astA*, arginina succiniltransferasa; *astB*, succinilarginina dehidrolasa; *astC*, succinilornitina transaminasa; *astD*, succinilglutámico semialdehído deshidrogenasa; *astE*, succinilglutamato desuccinilasa. En rojo se indican los genes que se encontraron reprimidos en el ensayo de microarreglos (tabla R&D.II.1).

La región promotora del operón *ast* contiene sitios de unión a diversos reguladores, entre ellos NtrC (proteína reguladora de nitrógeno C, también denominado NR_I, regulador de nitrógeno I), CRP (regulador transcripcional global activado por AMP cíclico), y ArgR (represor de la biosíntesis de arginina). La proteína NtrC es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes NtrB/NtrC, cuya actividad se encuentra inducida en condiciones de deprivación de amonio en el medio (265). En *Salmonella Typhimurium*, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, la inducción de la expresión del operón *ast* requiere de una proteína represora ArgR funcional. Por otra parte, para la inducción del sistema bajo condiciones limitantes de carbono se necesita tanto de las proteínas CRP como ArgR funcionales (266). Es interesante destacar que el gen *crp* también se encuentra entre aquellos identificados como reprimidos por ácido linoleico de manera PhoP-dependiente en los resultados de los experimentos de microarreglos (tabla R&D.II.1). Sin embargo, la búsqueda mediante el servidor MAST de cajas putativas de unión a PhoP en la región promotora tanto del gen *crp* como del gen *argR* no arrojó resultados positivos. Entonces, en una primera aproximación experimental, decidimos realizar este análisis sobre las

secuencias del operón *ast* y de los genes *glnL-glnG* (*ntrB-ntrC*), cuyos resultados se muestran en la tabla R&D.II.2.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>astCADBE</i>	CTC TGTTTA TGCAAT TGTTAA CGC ... 093 ... ATG	+1
	CGA TCAACA CGCC GC AAAA TTG ... 067 ... ATG	-1
	ATG ... 391 ... AGG TTAACG GCCCG ACAAC AGAC	-1
<i>ntrB-ntrC</i>	ATG ... 672 ... GG CCGTTTC GAGCAG GGCTG ACGG	+1
	ATG ... 1120 ... AGG TATTGA TCCAG GATTTA ACGG	+1

TABLA R&D.II.2: Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP. Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

El análisis de los resultados muestra que existe una caja putativa de unión a PhoP en la región promotora de este operón, 105 pb corriente arriba (tomando el centro de la secuencia consenso) respecto al sitio de inicio de la traducción del gen *astC*, el primero del operón *ast*. Por otra parte, para el caso de *ntrBC*, se encontraron 4 cajas posibles de reconocimiento por el regulador transcripcional PhoP; mientras que 3 de ellas se localizan dentro de la secuencia codificante de *ntrC*, otro de los sitios probables se encuentra dentro de la secuencia del gen *ntrB*, corriente arriba del ATG que inicia la síntesis de la proteína NtrC. Además, a pesar de que los genes *ntrB* y *ntrC* no han sido identificados en la lista de elementos putativos (figura R&D.II.1, conjunto excluido de la izquierda), su expresión se encuentra disminuida cuando se buscan estos genes en el conjunto de resultados *phoP*-/*wt*- (valores M de -1,24, -1,53 y -1,99 para *ntrB*; y de -1,67, -2,09 y -2,48 para *ntrC*), indicando que podría tratarse de genes PhoP-activados. Esto nos lleva a hipotetizar que los resultados observados sobre la expresión del operón *ast* en los ensayos de microarreglos podrían ser debidos a una

regulación directa por parte de PhoP o por una vía indirecta que involucre a NtrB/NtrC.

Como se mencionó previamente, la expresión del operón *ast* está sujeta a la regulación por parte de NtrC, ArgR y CRP. Se ha confirmado mediante ensayos de protección a la DNasa I (266) la unión de NtrC a dos sitios ubicados en una región de 55 pb que se encuentra localizada 303 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *astC*. En ese mismo estudio también se define la zona de protección por parte de ArgR, 138 pb ubicados a 169 pb respecto del ATG de inicio de *astC*. La caja putativa de unión a PhoP identificada en nuestro análisis se ubica ligeramente superpuesta al último hemisio de unión a ArgR. Además, corriente abajo de todos estos elementos regulatorios se localiza la región promotora para el factor σ^{54} , y ha sido propuesto que la función de ArgR es unirse a la región localizada ente los sitios de NtrC y el factor σ^{54} , de manera de acercar NtrC a la ARN polimerasa y promover la transcripción del operón *ast* (266). En este sentido, podemos hipotetizar que la unión del regulador de respuesta PhoP en esta misma zona podría estar produciendo un efecto análogo, es decir, acercando los sitios de unión de los diversos reguladores para lograr la formación del complejo con la ARN polimerasa y la consecuente transcripción del operón.

Por su parte, el operón *glt* (*gltI-sroC-gltJKL-rihA-STM14_0768*) codifica para un sistema ABC implicado en el transporte de glutamato y aspartato. Los genes *gltIJKL* codifican para las unidades estructurales del sistema y para una proteína de unión a ATP, respectivamente, mientras que el gen *sroC* está anotado como codificando para un ARN pequeño no codificante (267) y *rihA* codifica para una ribonucleósido hidrolasa específica de pirimidinas. No existe función asignada para el último gen del operón. Más allá de la anotación de estos genes como parte de un sistema de transporte de glutamato-aspartato, no existe evidencia que apoye esta posibilidad (260, 268). Un estudio reciente realizado por Zimmer y cols. muestra que el operón *gltIJKL* de *E. coli* se encuentra inducido en condiciones de nitrógeno limitante, y que esta activación está dada por los factores de transcripción NtrC y Nac (260). Además, previamente se estableció que la proteína NtrC promueve la transcripción del gen *nac*. Trabajos previos utilizando ensayos de Northern blotting no detectaron la presencia del gen *nac* en *S. Typhimurium* (269). No obstante, un análisis mediante el algoritmo BLAST utilizando como secuencia de búsqueda la del

gen *nac* de *Salmonella* Typhi sobre el genoma de *S. Typhimurium* 14028s arrojó una secuencia con un 78% de identidad, identificada como STM14_0807. Esta secuencia esta anotada como un regulador transcripcional putativo de la familia LysR, similar a la proteína Nac de *E. coli*. Sin embargo, la funcionalidad de la proteína codificada por este gen no ha sido ensayada.

Los resultados provenientes del análisis del operón *glt* y del gen *nac* de *Salmonella* Typhimurium 14028s se muestran en la tabla R&D.II.3. Para el primero de ellos, puede apreciarse que ambas secuencias putativas se localizan dentro de las regiones codificantes de los genes; la primera se encuentra inserta en el gen *gltL*, a 145 pb del ATG de inicio de la traducción del mismo y a 695 pb del ATG del siguiente gen *rihA*, en tanto la segunda se ubica dentro del último gen del operón, STM14_0768. El gen *rihA* codifica para una ribonucleósido hidrolasa y, si bien no ha sido encontrado en la lista de genes putativos (figura R&D.II.1, conjunto excluido de la izquierda), su expresión se encuentra disminuida (valores M de -1,75, -1,88 y -2,64) cuando se busca este gen en el conjunto de resultados *phoP*-/*wt*-, indicando que su expresión podría estar regulada por PhoP.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>glt</i>	ATG ... 133 ... CCG TCAACG GTCTG GAACCA GTG ... 683 ... ATG	-1
	ATG ... 203 ... ATT TGTTT ATGCCG GTTTT AGCA	+1
<i>nac</i>	AAC TAATCA CAGCC TCTATC TTT ... 179... ATG	-1
	ATG ... 081 ... GTT TCAGCA TTAAG TCAAC AGAT	-1

TABLA R&D.II.3: Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP. Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

En cuanto al segundo gen, existe un sitio probable de unión en la región promotora del gen STM14_0807 (*nac*), mientras que otro de ellos se ubica dentro de

la región codificante del mismo. En este caso, al igual que lo mencionado para el operón *ast*, cabe la posibilidad de que los cambios observados en los ensayos de microarreglos sean debidos a una acción directa de PhoP sobre la expresión del operón o a una regulación indirecta que involucre a NtrC y/o Nac.

El gen *argD* codifica una proteína bifuncional N-succinildiaminopimelato aminotransferasa/acetilornitina transaminasa. Esta enzima es requerida para la biosíntesis de arginina a través de una serie de intermediarios N-acetilados, incluyendo N-acetilornitina (figura R&D.II.4). La represión del gen *argD* es mediada por ArgR, el represor de arginina (270).

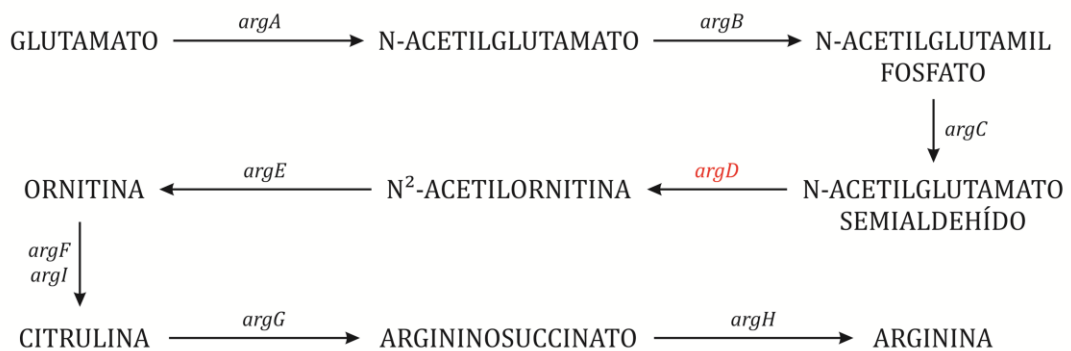


FIGURA R&D.II.4: Vía de síntesis de arginina. Los genes indicados codifican para las enzimas: *argA*, N-acetilglutamato sintasa; *argB*, acetilglutamato quinasa; *argC*, N-acetilglutamil fosfato reductasa; *argD*, acetilornitina transaminasa; *argE*, acetilornitina deacetilasa; *argF*, *argI*, ornitina carbamoiltransferasas; *argG*, argininosuccinato sintasa; *argH*, argininosuccinato liasa. En rojo se indica el gen que se encontró reprimido en el ensayo de microarreglos (tabla R&D.II.1).

Por último, el gen *argT* codifica para la proteína periplásmica de unión a lisina-arginina-ornitina ArgT. En *S. Typhimurium*, corriente abajo de este gen se encuentra el operón de transporte de histidina *hisJQMP*. Los componentes de membrana de este transportador ABC interaccionan con dos proteínas periplásmicas diferentes con distinta especificidad de sustrato: HisJ, que une histidina y arginina, y ArgT, que une lisina, arginina y ornitina (271, 272). Cabe mencionar que el gen *hisJ* también se encuentra entre aquellos identificados como activados por PhoP e inhibidos en presencia de ácido linoleico en los ensayos de microarreglos (tabla R&D.II.1, no mostrado). Se ha observado que la limitación de nitrógeno induce ArgT en *E. coli* y en *S. Typhimurium*, y que esta inducción no requiere de arginina (260, 272). Los resultados obtenidos para los genes *argD* y *argT* se visualizan en la tabla

R&D.II.4. En estos casos, ambas cajas putativas de unión del factor de transcripción PhoP se encuentran en las regiones promotoras de los genes *arg* mencionados.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>argD</i>	TGC TATTGA GTGAT TTTTTA TTC ... 054 ... ATG	+1
<i>argT</i>	TCT TCAACA TCAGG ACAATA TTG ... 133 ... ATG	-1

TABLA R&D.II.4: Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP. Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

Otra de las vías implicadas en el catabolismo de arginina, además de la vía de la arginina succiniltransferasa (AST), es la vía de la arginina deiminasa (ADI). En general, tres enzimas constituyen el sistema ADI: arginina deiminasa (ADI), ornitina transcarbamoilasa (OTC), y carbamato quinasa (CK), las cuales catalizan la conversión de L-arginina en ornitina, amonio y dióxido de carbono con la formación de ATP (273). Esta vía enzimática se encuentra ampliamente distribuida y se conoce que provee energía celular, particularmente en condiciones de oxígeno limitado. Además de su función metabólica, el sistema ADI es empleado, por ejemplo por *Streptococcus pyogenes*, para resistir la acidez mediante la generación de amonio, de esta manera neutralizando pH ácido (274, 275). *In vivo*, esta vía podría servir como fuente de energía, dado que una molécula de ATP es producida por cada molécula de arginina. Concomitantemente, se forma ornitina, que puede ser degradada en una reacción de un solo paso a la poliamina putrescina. Las poliaminas poseen diversas funciones, desde mantener la conformación óptima de los ácidos nucleicos, como constituyentes de la membrana externa, o protegiendo frente al stress oxidativo o ácido para contribuir con la patogénesis (276).

Estudios previos han revelado que cepas de *S. Typhimurium* auxótrofas para purinas, pirimidinas y aminoácidos son incapaces de sobrevivir dentro de macrófagos (10, 277). Un trabajo realizado por Choi y colaboradores ha demostrado que la actividad ADI en *S. Typhimurium* juega un rol en la infección exitosa del hospedador

mamífero. Una cepa mutante en la enzima ADI fue deficiente en la replicación dentro de macrófagos murinos y atenuada en la virulencia en ratones. Más aún, la expresión de los genes de la vía ADI se encontró aumentada dentro de los macrófagos (273).

En base a estos antecedentes es que decidimos realizar la búsqueda de cajas probables de unión a PhoP en la región de los genes que codifican para la vía ADI. En *S. Typhimurium* 14028s no han sido descritos y caracterizados los genes de esta vía; sin embargo, una búsqueda rápida en el genoma de esta cepa permitió la identificación de un locus (que denominaremos *adi*) con una organización similar a lo reportado (273). En esta cepa, los genes han sido anotados como STM14_5361 (ADI putativa), STM14_5360 (CK putativa), STM14_5358 (OTC putativa), STM14_5357 (anti-transportador arginina/ornitina putativo) y STM14_5355 (ArgR putativa). El análisis de este locus brindó como resultado una única secuencia hipotética de unión a PhoP, que se detalla en la tabla R&D.II.5.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>adi</i>	TAA TTAACA ATAGAAA ATA ACAA ... 240 ... ATG	-1

TABLA R&D.II.5: Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP. Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

De manera adicional, la vía ADI podría jugar un rol en el escape a los sistemas de defensa del hospedador. De hecho, en células eucariotas, la arginina es el sustrato de varias enzimas, entre ellas la sintasa de óxido nítrico (NOS), responsable de la producción de óxido nítrico (NO) (278–280). Una sintasa de óxido nítrico particular, la NOS inducible (iNOS), es inducida por LPS, proteínas de membrana externa o citoquinas en diversas células y tejidos, incluyendo células de epitelio intestinal (279, 281, 282). Las grandes cantidades de NO producido por la iNOS en células epiteliales se consideran beneficiosas, dado que pueden tener efecto letal sobre la bacteria infectiva (283, 284). Sin embargo, si la arginina es limitante, solo pequeñas cantidades de NO serán producidas. Por lo tanto, la expresión de vías de catabolismo de arginina que reduzcan los niveles de arginina del pool de aminoácidos del

hospedador puede ser un mecanismo para evitar la acumulación de NO y la muerte de *Salmonella*.

Finalmente, se ha comprobado que varios patógenos alteran el metabolismo de arginina dentro de las células del hospedador (285–287). Recientemente, se ha determinado que la proteína ArgT se encuentra inducida entre 2 y 3 veces luego de la infección por *S. Typhimurium* (288). Más aún, los autores establecieron que *Salmonella* intravacuolar recluta los transportadores de arginina de la célula hospedadora, pero también adquiere la arginina del hospedador a través de su propio transportador, ArgT. Por su parte, las mutantes en *argT* presentaron crecimiento atenuado tanto en macrófagos como en un modelo de infección murino, indicando que la proteína ArgT es un determinante esencial en la virulencia de esta bacteria (288). El incremento en la cantidad de transportadores de arginina del hospedador en respuesta a la infección por *Salmonella* es un mecanismo de inmunidad innata tendiente a aumentar la producción de NO de la célula infectada, para controlar la infección por esta bacteria. Sin embargo, este mecanismo es aprovechado por el patógeno en su propio beneficio: los transportadores del hospedador son localizados en la vacuola conteniendo a *Salmonella* (SCV), llevando a un aumento en la captación de arginina por parte de la bacteria. De esta manera, *Salmonella* captura la arginina y la mantiene lejos de la vía de síntesis de NO. Adicionalmente, la bacteria adquiere arginina para la síntesis proteica propia sin costo adicional (288).

Nuestros resultados de los experimentos de microarreglos muestran que diversos genes involucrados en el transporte y metabolismo de arginina se encuentran afectados en presencia del regulador PhoP. De validarse estas observaciones, podríamos especular que la activación del sistema PhoP/PhoQ promovería la captación de la arginina presente en el hospedador y la degradación de la misma por las vías AST y ADI, lo que mantendría bajos los niveles de óxido nítrico y generaría glutamato y amonio, que sirven como fuente intracelular de nitrógeno y como neutralizador del pH ácido intravacuolar, respectivamente. De verificarse nuestra hipótesis, estaríamos en condiciones de establecer un nuevo blanco de regulación del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, que tendría como finalidad promover la sobrevivencia intracelular de *Salmonella* mediante la modulación del metabolismo de aminoácidos durante el proceso infectivo de esta bacteria.

3. b. *Metabolismo de poliaminas*

Otros de los procesos que mostraron gran cantidad de genes afectados en nuestro análisis fueron el transporte y metabolismo de poliaminas. En este caso, los genes *gabT*, *gabD*, *gabP*, *potF*, *potH* y *gsp* se encontraron reprimidos en presencia de ácido linoleico y de manera dependiente de PhoP. Los tres primeros genes mencionados forman parte del operón *gabDTPC*, el cuarto y quinto gen también forman parte de otro operón, *potFGHI*, mientras que el último gen codifica para una proteína bifuncional glutationilespermidina amidasa/glutationilespermidina sintetasa, que cataliza la formación de glutationilespermidina a partir de glutatión y espermidina (así como también la reacción inversa).

Las poliaminas son pequeñas aminos catiónicas presentes en todas las células vivas. Las principales poliaminas en bacterias son putrescina y espermidina (289), y están involucradas en diversas funciones que incluyen señalización intracelular, resistencia a stress, resistencia a péptidos catiónicos, aminoglicósidos y quinolonas, y síntesis de ARN y proteínas (290–293). El contenido de poliaminas en las células está complejamente regulado por la biosíntesis, degradación, captación y excreción (294). Los precursores en la biosíntesis de putrescina son arginina (a través de agmatina) y ornitina, mientras que la degradación de la misma lleva a la generación de ácido γ -aminobutírico (GABA) y posteriormente a succinato (figura R&D.II.5).

El operón *gabDTPC* sintetiza las proteínas responsables del catabolismo de ácido γ -aminobutírico (figura R&D.II.5), uno de los intermediarios en la degradación de poliaminas. Cada gen del operón ha sido implicado en el catabolismo de GABA: *GabD*, una succinato semialdehído dehidrogenasa NADP específica que convierte succinato semialdehído en succinato; *GabT*, una transaminasa que desamina GABA a succinato semialdehído; y *GabP*, una permeasa para GABA (259, 295). Por su parte, *GabC* parece ser un represor específico, ya que una delección en *gabC* estimula el crecimiento con GABA como única fuente de nitrógeno (261). Tanto la limitación en nitrógeno como el ingreso en fase estacionaria de crecimiento activan la expresión del operón *gab*, mientras que en la primera de las condiciones se requiere de la proteína *Nac*, en el segundo caso es necesario el factor σ^S (260, 296, 297).

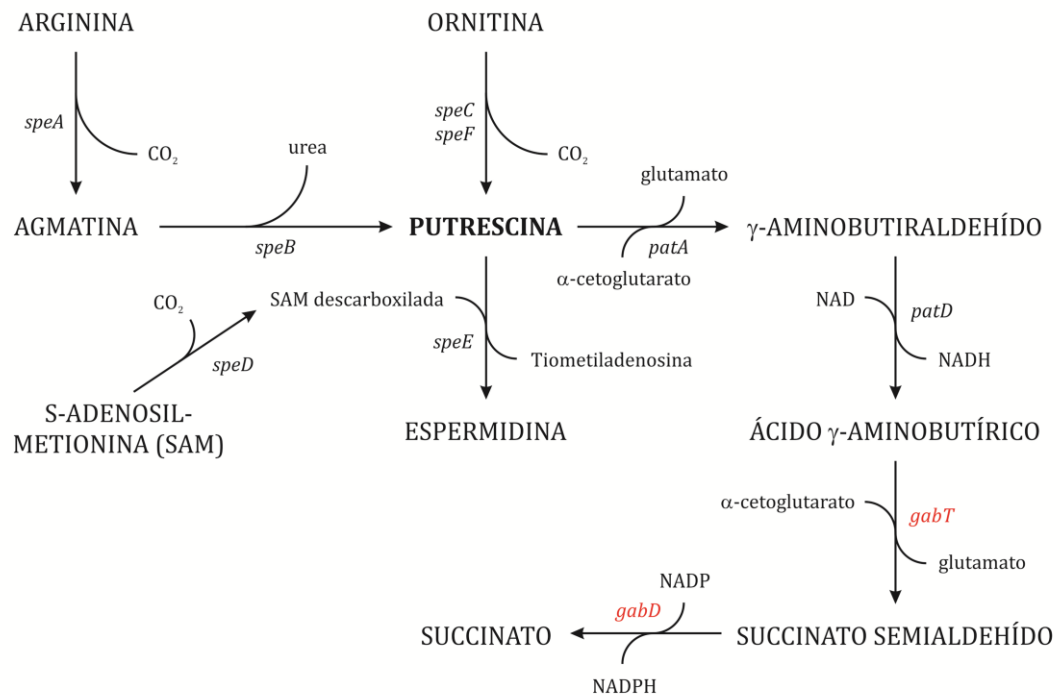


FIGURA R&D.II.5: Vías de síntesis y catabolismo de poliaminas. Los genes indicados codifican para las enzimas: *speA*, arginina decarboxilasa; *speB*, agmatinasa; *speC*, *speF*, ornitina decarboxilasas; *speD*, S-adenosilmetionina (SAM) decarboxilasa; *speE*, espermidina sintasa; *patA*, putrescina transaminasa; *patD*, γ -aminobutiraldehído deshidrogenasa NAD-dependiente; *gabT*, γ -aminobutirato aminotransferasa; *gabD*, succinato semialdehído deshidrogenasa I. En rojo se indican los genes que se encontraron reprimidos en el ensayo de microarreglos (tabla R&D.II.1).

Por su parte, el operón *potFGHI* expresa un sistema de transporte ABC de captación de poliaminas. Hay dos sistemas de captación de poliaminas que funcionan a pH neutro, ambos pertenecientes a la familia de transportadores que unen ATP: uno, conformado por las proteínas PotA, PotB, PotC y PotD, que capta espermidina de modo preferencial; y otro, específico para captación de putrescina, que comprende las proteínas PotF, PotG, PotH y PotI (figura R&D.II.6). La primera, PotF, es la proteína periplásmica de unión a sustrato (putrescina); PotG es la proteína de unión a ATP; mientras que PotH y PotI son las proteínas integrales de membrana de este sistema de transporte de tipo ABC.

Otros dos transportadores de poliaminas, formados por una sola proteína, son PotE y CadB, que funcionan como anti-transportadores de putrescina/ornitina y cadaverina/lisina, respectivamente (294). Los genes *potE* y *cadB* constituyen un operón con genes para la ornitina decarboxilasa inducible (*speF*) o la lisina decarboxilasa inducible (*cadA*), respectivamente. Estas cuatro proteínas (PotE, CadB, SpeF y CadA) son importantes para el crecimiento celular a pH ácido porque pueden

ayudar a neutralizar el pH en el medio mediante la excreción de poliaminas (298, 299). También se ha reportado un nuevo transportador de putrescina PuuP, como una de las proteínas involucradas en la vía de utilización de putrescina (300). Además, la espermidina es excretada a través de MdtI cuando esta poliamina se sobreacumula en *E. coli* (301).

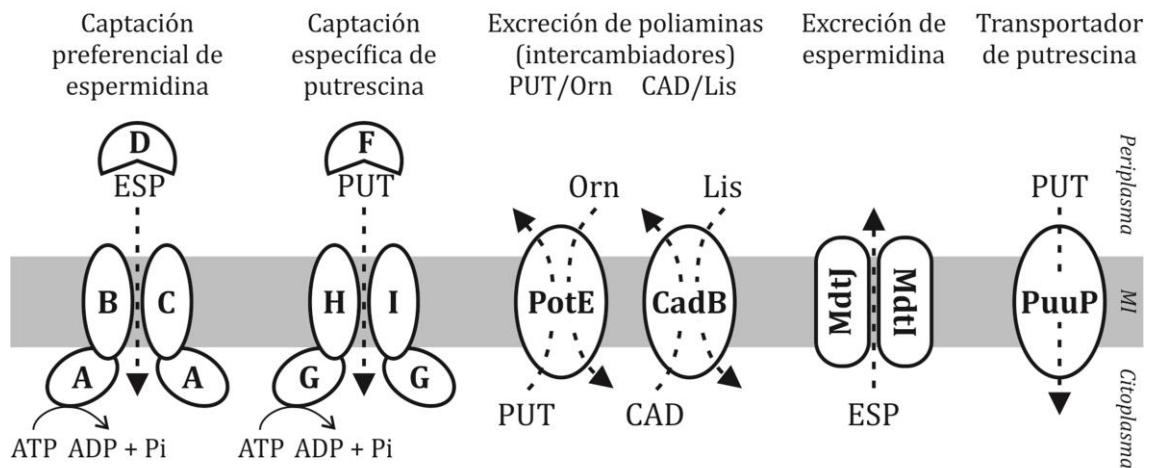


FIGURA R&D.II.6: *Sistemas de transporte de poliaminas.* Las letras indican la proteína Pot correspondiente. ESP, espermidina; PUT, putrescina; Orn, ornitina; CAD, cadaverina; Lis, lisina; MI, membrana interna. Los genes que se encontraron reprimidos en el ensayo de microarreglos (tabla R&D.II.1) codifican para las proteínas PotF y PotH.

Los resultados obtenidos del análisis de los operones *gabDTPC* y *potFGHI* se visualizan en la tabla R&D.II.6. Para el primero de ellos, el sitio de unión predicho para PhoP se ubica en el marco de lectura del gen *gabT*; mientras que para el caso de los genes *pot*, la caja PhoP encontrada está localizada en la secuencia codificante para el gen *potH*. Si bien es necesaria la correcta verificación, estos resultados son llamativos dado que las supuestas cajas de unión al regulador de respuesta se encuentran dentro o corriente abajo de los genes que se identificaron como reprimidos en el ensayo de microarreglos (*gabT*, *gabD*, *gabP*, *potF* y *potH*). Por último, no se encontraron secuencias probables de unión a PhoP en las regiones promotora o codificante del gen *gsp*.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>gabDTPC</i>	ATG ... 324 ... ACC GGTTCA GAAGC GGTTG AAAA ... 1063 ... ATG	+1
<i>potFGHI</i>	ATG ... 555 ... GTC TATATC GGCAT TGTTTA TGC ... 369 ... ATG	+1
<i>speB</i>	CCG TAAACA AATT CAAACCC TTC ... 060 ... ATG	-1

TABLA R&D.II.6: Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP. Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

Más allá de estos resultados, se decidió ampliar la búsqueda de genes regulados por la proteína PhoP a aquellos relacionados con la síntesis de putrescina. Se analizó la secuencia de los genes *speA*, *speB*, *speC*, *speED* y *speF-potE*. No se obtuvieron resultados positivos excepto para los casos de *speB* y *speF-potE*, si bien para éstos últimos la caja predicha de unión al regulador de respuesta se ubica dentro del marco de lectura del gen *potE*, por lo que no se continuó con su análisis. Sin embargo, en el caso de *speB* (que codifica la enzima encargada de la conversión de agmatina en putrescina, con la concomitante liberación de urea, figura R&D.II.5) se detectó un sitio putativo de unión a PhoP a 72 pb respecto al ATG de inicio de la traducción (tabla R&D.II.6). Más aún, una búsqueda en los resultados del ensayo de microarreglos muestra que la expresión de *speB* se encuentra disminuida (valores M de -2,15, -2,13 y -1,45) en un fondo *phoP* respecto al entorno salvaje.

Se ha visto que las poliaminas son requeridas para la virulencia en *S. Typhimurium* (302, 303). En estudios del perfil de expresión génica de *S. Typhimurium* intracelular se ha revelado que la expresión de genes para la captación de putrescina y espermidina está activada durante la infección de células epiteliales y macrófagos. Además, una mutante en la síntesis de poliaminas es defectiva en la invasión, la sobrevivencia intracelular, la muerte del nematodo *Caenorhabditis elegans* y la infección sistémica en un modelo murino de fiebre tifoidea (302). La invasión y sobrevivencia intracelular pueden ser complementadas por la adición de putrescina y espermidina exógena al medio de crecimiento previo a la infección, indicando que estas poliaminas funcionan como una señal ambiental que prepara a *Salmonella* para

la supervivencia intracelular. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de los genes de los mayores locus de virulencia, SPI-1 y SPI-2, se activa frente a la presencia de poliaminas exógenas, mientras que se encuentra reducida en una mutante, indicando que estos compuestos funcionan como señales en las cascadas regulatorias que controlan la expresión de genes de virulencia en *S. Typhimurium* (302).

3. c. Mecanismo de sensado de la densidad de población celular (quorum sensing)

Las bacterias regulan la expresión génica en respuesta a cambios en la densidad de población celular mediante un proceso llamado *quorum sensing*. Específicamente, las bacterias que poseen este mecanismo liberan y detectan moléculas químicas señalizadoras llamadas autoinductores, y responden a la acumulación de una concentración estimuladora umbral de estas moléculas. La detección de los autoinductores permite a la bacteria distinguir entre densidades de población altas y bajas, y controlar la expresión de genes blanco en respuesta a fluctuaciones en el número celular (304). Los autoinductores son altamente específicos para las especies que los producen, ya que autoinductores producidos por una especie usualmente no influyen la expresión de genes en otras especies (304). Una excepción es el caso del autoinductor-2 (AI-2). Este autoinductor es producido a partir de S-ribosilhomocisteína (SRH), un producto en la vía de utilización de S-adenosilmetionina (SAM). Específicamente, la proteína LuxS produce el clivaje de SRH para formar homocisteína y AI-2 (305). Más de 55 especies de Gram-negativos y Gram-positivos producen AI-2 (306), y la evidencia actual sugiere que las estructuras de estas moléculas son idénticas en diferentes especies bacterianas. Esto es consistente con un rol de este compuesto como señal universal utilizada para la comunicación bacteriana entre especies (307, 308), dado que una estructura señal común podría ser requerida para ser reconocida por múltiples miembros dentro de una comunidad con mezcla de especies (305).

En *Salmonella Typhimurium*, el sistema encargado de la detección y captación de AI-2 se encuentra codificado en el operón *lsr* (por *luxS* regulated). La organización génica de este operón se muestra en la figura R&D.II.7. El primer gen del

operón, *lsrA*, codifica para una proteína homóloga a la ATPasa RbsA. Los genes *lsrC* y *lsrD* son homólogos entre sí y con *rbsC*, y está predicho que sintetizan los componentes de un canal de membrana heterodimérico. Por su parte, *lsrB* codifica para una putativa proteína de unión a azúcares homóloga a RbsB. Los genes corriente abajo, *lsrF* y *lsrG*, está predicho que codifiquen para una aldolasa putativa y para una proteína que degrada AI-2, respectivamente. Por su parte, el último gen del operón está anotado como STM14_4905 y es homólogo a una ribulosa fosfato epimerasa de *E. coli* (*rpe*) (304). En sentido divergente a este locus se encuentran otros dos genes: *lsrR*, un regulador transcripcional putativo, que reprime la expresión del operón *lsr* en ausencia de AI-2; y *lsrK*, una quinasa citoplásmica que fosforila AI-2 cuando ingresa a la célula (304, 309).

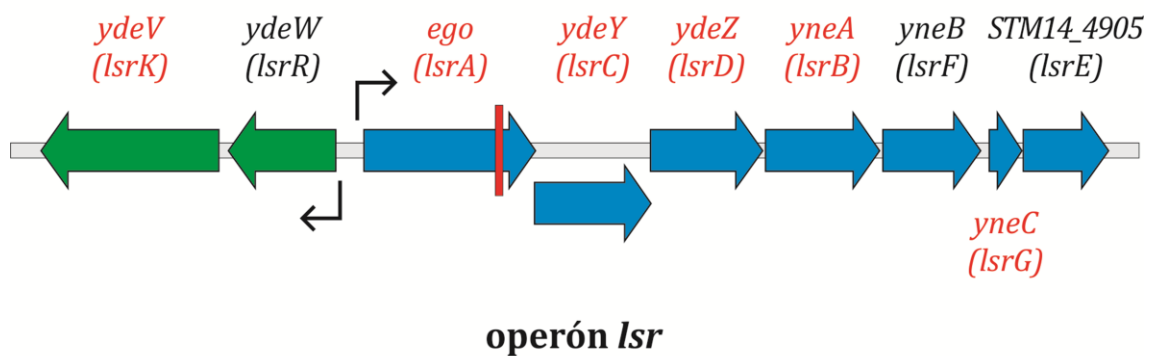


FIGURA R&D.II.7: Organización del operón *lsr*. Los genes indicados codifican para las enzimas: *ydeV*, quinasa de AI-2; *ydeW*, represor transcripcional putativo; *ego*, proteína de unión a ATP; *ydeY*, *ydeZ*, proteínas canal de membrana; *yneA*, proteína periplásmica de unión a AI-2; *yneB*, aldolasa putativa; *yneC*, proteína degradadora de AI-2; *STM14_4905*, ribulosa fosfato 3-epimerasa putativa. Se muestran los sitios de inicio de la transcripción según (267) (flechas) y la localización de la caja putativa de unión a PhoP (rectángulo rojo). En rojo se indican los genes que se encontraron reprimidos en el ensayo de microarreglos (tabla R&D.II.1).

En cuanto a la regulación de este sistema, el mismo se encuentra inducido en presencia de LuxS y AI-2. Además, la regulación de la expresión del operón *lsr* por parte de AI-2 requiere de la proteína reguladora de unión a ADN LsrR, represor del sistema (304). El mecanismo propuesto para el sistema sería que existe una expresión basal del operón *lsr*, lo que resulta en producción de una pequeña cantidad del sistema de transporte Lsr. El transportador permite la internalización de una pequeña cantidad de AI-2, el cual es fosforilado por LsrK (que no está regulada por *luxS* o AI-2) y secuestrado en el citoplasma. Entonces, fosfo-AI-2 induce la

transcripción del operón *lsr* por inactivación del represor LsrR (309). Se ha determinado en *E. coli* los sitios de unión específicos para LsrR en la región promotora del operón *lsr*, y también se demostró que fosfo-AI-2 deja inactivo a LsrR en su capacidad de unirse al ADN y reprimir la expresión de este operón (310). La inducción en la transcripción de *lsr* resulta en una producción incrementada del transportador, lo que provoca un aumento en la importación y fosforilación de AI-2, y este circuito de retroalimentación lleva a altos niveles de expresión del operón *lsr*. Por último, LsrF y LsrG procesan a fosfo-AI-2 para formar producto(s) que son incapaces de interaccionar con LsrR (309).

Puede parecer fútil un mecanismo en el cual *S. Typhimurium* sintetiza y libera AI-2, solo para importarlo y modificarlo luego. Sin embargo, la producción de una señal acoplada a la subsecuente eliminación puede permitir a este microorganismo tener flexibilidad en la transición entre diversos modos de existencia. Por ejemplo, como AI-2 se asocia con la presencia de varias especies bacterianas, altos niveles de AI-2 pueden ser indicativos de la transición desde fuera del hospedador al ambiente intestinal, mientras que bajos niveles de AI-2 pueden indicar a *Salmonella* que ha salido del tracto intestinal hacia la siguiente localización en la infección, por ejemplo macrófagos, donde *S. Typhimurium* no se encuentra asociada con un gran número de bacterias comensales (304).

Por lo tanto, la actividad del sistema de *quorum sensing* debe regular procesos que requieren la cooperación de un cierto número de bacterias para ser efectivos y donde los individuos en el grupo se benefician a partir de la actividad de todo el conjunto celular, como por ejemplo bioluminiscencia, virulencia, producción de antibióticos, esporulación y formación de biopelículas (304, 311–317). En este sentido, estudios recientes han revelado la importancia del sistema de *quorum sensing* en la virulencia de *S. Typhimurium*. Se ha visto que un aumento en la densidad de población celular lleva a la inducción de *invF*, cuyo producto es un regulador primario de la isla de patogénesis 1 de *Salmonella* (SPI-1), con la consecuente activación de genes expresados desde SPI-1. Esta activación de *invF* es dependiente de la presencia de LuxS o de la adición externa de AI-2. Además, la disminución en la expresión de *invF* en un entorno mutante *luxS* redujo los niveles de transcripción de *sigD* y *sopE*, efectores del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) codificado en SPI-1. Más aún, una cepa *luxS* de *S. Typhimurium* presenta niveles

reducidos de invasión a células epiteliales y virulencia atenuada en ratones, consistente con la disminución observada en la expresión de los genes de SPI-1 (318). Un estudio posterior demostró que el represor transcripcional LsrR también estaba asociado con la virulencia de *Salmonella* mediada por SPI-1. Así, la presencia de una proteína LuxS funcional permite la generación de fosfo-AI-2, que interactúa con e inactiva a LsrR, lo cual promueve la expresión de genes flagelares y SPI-1 regulados. Finalmente, se comprobó que la proteína LsrR activa es la responsable de la imposibilidad de *Salmonella* de invadir células epiteliales (319). Estos resultados permiten postular un modelo mediante el cual *Salmonella* reconocería el sitio de infección a través de la detección e internalización de moléculas señalizadoras AI-2 producidas por microorganismos de la flora normal del intestino, además de reconocer señales ambientales como alta osmolaridad o concentraciones milimolares de cationes divalentes, para inducir la expresión de SPI-1 (320). Entonces, las moléculas de AI-2 producidas por la flora normal se acumularían en el tracto gastrointestinal. La habilidad de *Salmonella* de degradar estas moléculas puede ser beneficiosa para su virulencia dado que el consumo de AI-2 podría interferir con la comunicación entre otras especies bacterianas, y tal vez perturbar la flora de una manera que sea favorable para la patogenicidad de *Salmonella*.

Estos resultados están en concordancia con los observados en nuestros ensayos de microarreglos. Nuestro análisis ha detectado que varios genes pertenecientes al operón *lsr* (*ydeZ*, *yneA*, *yneC*, *ydeY* y *ego*) así como el gen que codifica para la quinasa LsrK (*ydeV*) podrían ser activados por PhoP. De esta manera, en las condiciones ambientales presentes en el lumen del intestino, el sistema PhoP/PhoQ se encuentra inactivo, no hay activación del operón *lsr*, promoviendo la expresión de los genes de SPI-1 como ha sido descrito (13, 20, 22, 105, 121, 141, 321, 322). El análisis de las secuencias promotora y codificante del operón *lsr* mediante el servidor MAST llevó a la identificación de dos regiones putativas de unión al regulador de respuesta PhoP, como se muestra en la tabla R&D.II.7.

Gen / Operon	Secuencia	Hebra
<i>lsrACDBFGE</i>	ATG ... 1203 ... ACT TTATCCGGCGGTAACCA GCA ... 300 ... ATG	-1
	ATG ... 584 ... CGT TATTGATGGGT CGTTAACGC	+1

TABLA R&D.II.7: *Cajas putativas de unión al regulador transcripcional PhoP.* Se indica en negrita los motivos consenso encontrados en la región promotora o dentro de la secuencia codificante de los genes u operones, mediante el análisis con el servidor MAST. En números se indica la distancia en pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, respecto al codón de inicio de la traducción (ATG).

La primera de las secuencias mostrada se localiza dentro del marco de lectura del gen *ego* (*lsrA*), mientras que la segunda se ubica al final de la secuencia codificante de STM14_4905 (*lsrE*). Dada la ubicación de esta última sobre el extremo 3' del operón, se descartó esta caja putativa en futuros análisis. La posición dentro del operón *lsr* de la primer caja predicha se muestra en la figura R&D.II.7. De verificarse la regulación por parte de PhoP sobre los genes que integran el sistema de *quorum sensing*, esto pondría de manifiesto un nuevo nivel de coordinación durante la infección por *S. Typhimurium*, siendo necesaria una determinada densidad de población celular para iniciar la invasión de las células epiteliales intestinales.

R&D. II. 4. Validación de los resultados del ensayo de microarreglos

Los resultados del experimento de microarreglos, en primera medida, y el análisis bioinformático sobre los genes putativos de ser regulados por PhoP, en segunda instancia, llevaron a detectar un conjunto de procesos que podrían ser nuevo blanco de regulación por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*. Entre ellos, los más relevantes fueron el metabolismo de aminoácidos (como arginina, glutamato y aspartato), la respuesta regulada por nitrógeno, el transporte y metabolismo de poliaminas, y el sensado de la densidad de población (*quorum sensing*). En base a los resultados bioinformáticos obtenidos, se decidió en primera instancia analizar si existía modulación por parte del regulador de respuesta PhoP mediante medidas de actividad transcripcional de los operones *ast* y *lsr*, y para el caso del gen *speB*. De todos los candidatos posibles que presentaron cajas de unión a PhoP, se decidió continuar el análisis sobre el operón *ast* y el gen *speB* porque fueron

aquellos en los que el sitio predicho se localizó en la región promotora de los mismos, y cuyas secuencias presentaban mayor correlación con la matriz de probabilidad generada a partir de promotores PhoP conocidos (figura R&D.II.2). En el caso del operón *lsr*, si bien la región putativa de unión a PhoP se ubicó dentro de la secuencia codificante para uno de los genes, decidimos continuar con el análisis porque resultaría muy interesante verificar que el mecanismo de *quorum sensing* se encuentre bajo el control del principal sistema de regulación de la virulencia en *Salmonella*, el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.

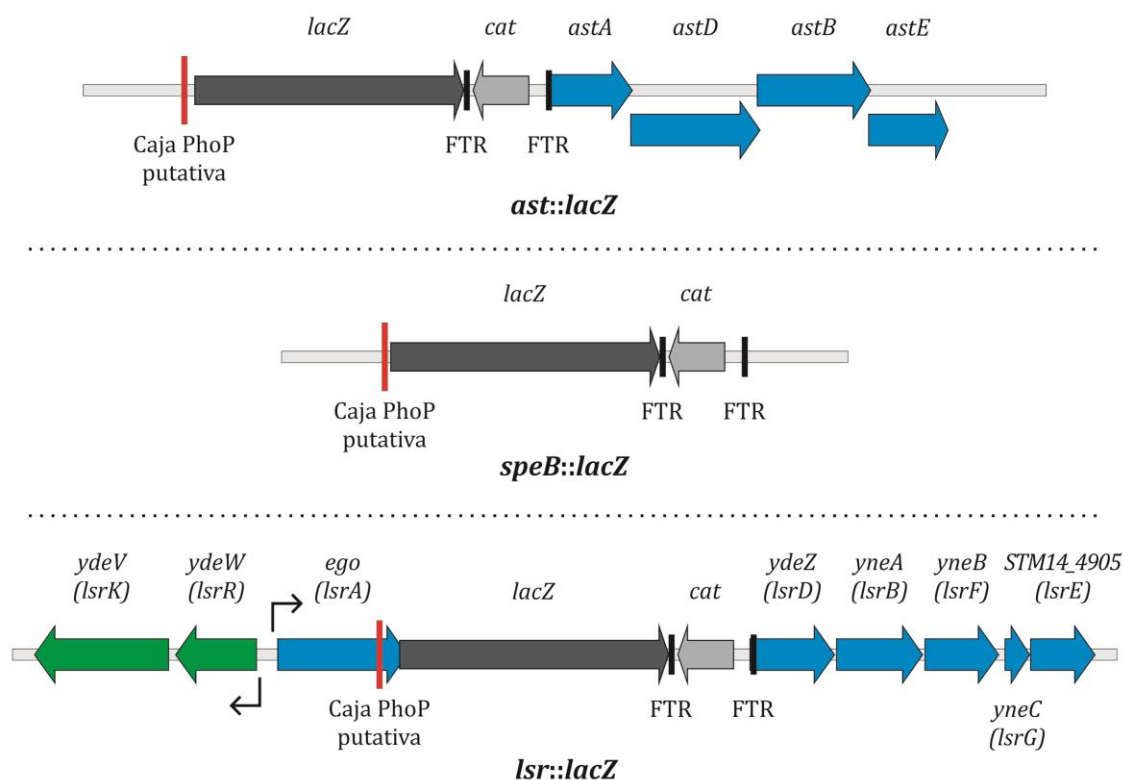


FIGURA R&D.II.8: Organización de las fusiones transcripcionales *ast::lacZ*, *speB::lacZ* y *lsr::lacZ*. Se muestra de manera esquemática el entorno génico luego de la construcción de las fusiones transcripcionales *ast::lacZ*, *speB::lacZ* y *lsr::lacZ*. Se indican las regiones codificantes para los genes de cada operon, para el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*), para la resistencia a cloranfenicol (*cat*), y la localización de los sitios de recombinación de la recombinasa *flp* (FRT) y de la caja putativa de unión a PhoP (rectángulo rojo).

Con el fin de determinar si la proteína PhoP regula la expresión de algunos de los genes previamente mencionados, se construyeron las fusiones reporteras *ast::lacZ*, *lsr::lacZ* y *speB::lacZ* mediante recombinación homóloga catalizada por λ Red, como se describe en la sección M&M.10. Para los casos de *ast* y *speB*, el gen

reportero *lacZ* fue insertado reemplazando la secuencia codificante para la primera proteína del operón (*astC*) o para la proteína individual respectiva; mientras que en el caso del operón *lsr*, la inserción del fragmento *lacZ* se realizó reemplazando la secuencia del gen *lsrC* (*ydeY*). Un esquema de la localización de cada fusión transcripcional a *lacZ* en cada cluster de genes se muestra en la figura R&D.II.8. Estas construcciones fueron chequeadas mediante PCR, y posteriormente se procedió a medir actividad β -galactosidasa de las mismas, tanto en un entorno de *S. Typhimurium* 14028s salvaje como *phoP*.

4. a. Medidas de actividad transcripcional de fusiones reporteras en los genes de interés

En una primera instancia, las medidas fueron realizadas a partir de las cepas conteniendo las fusiones reporteras crecidas hasta fase estacionaria, de acuerdo a lo descrito en la sección M&M.11. En esta condición, no pudo observarse actividad del reportero *ast::lacZ*, ni en entorno salvaje ni mutante *phoP*. Más aún, tampoco se obtuvo actividad de esta fusión transcripcional cuando las medidas se realizaron a partir de células crecidas hasta fase exponencial (no mostrado). Los resultados obtenidos para las fusiones *speB::lacZ* y *lsr::lacZ* en ambos entornos se muestran en la figura R&D.II.9.

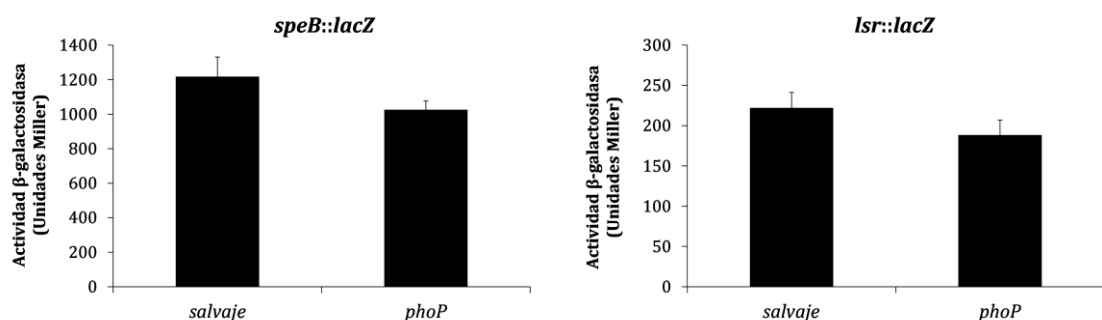


FIGURA R&D.II.9: Regulación por PhoP sobre nuevos blancos identificados. La actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *speB::lacZ* (izquierda) y *lsr::lacZ* (derecha) en entornos génicos salvaje o *phoP* fue medida en células crecidas toda la noche (estacionaria) a 37°C en agitación en medio de cultivo LB. Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En el gráfico superior puede apreciarse que, si bien existe una ligera disminución de actividad en un fondo mutante en el regulador de respuesta, no existen diferencias significativas entre la actividad transcripcional en entorno salvaje y *phoP*, en ninguno de los dos casos ensayados. Entonces, contrario a lo observado en los resultados del ensayo de microarreglos, no pudimos observar dependencia de PhoP en los niveles de expresión en fase estacionaria de crecimiento por parte de la proteína PhoP sobre el gen *speB* y el operón *lsr* en los ensayos de actividad β -galactosidasa.

Los resultados arriba expuestos nos llevaron a pensar que las condiciones ensayadas podían no ser las adecuadas para lograr una correcta expresión de los genes reporteros, para luego poder observar una diferencia significativa y establecer la regulación por parte del regulador de respuesta PhoP. Para probar esta hipótesis nos valimos de la herramienta *online* SalCom (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium Gene Expression Compendium, <http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom.pl>), que muestra los resultados de estudios de transcriptómica por RNA-seq sobre el genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium crecida bajo diversas condiciones de cultivo (267).

La búsqueda de los genes *speB* y de aquellos presentes en el operón *lsr* muestra que la expresión de los mismos es máxima en fase de crecimiento exponencial medio (MEP) y exponencial temprana (ESP), respectivamente (figura R&D.II.10). Para el caso del operón involucrado en *quorum sensing*, esto es congruente con reportes previos que indican que en *S. Typhimurium* el AI-2 extracelular se acumula hasta alcanzar niveles máximos en fase de crecimiento exponencial tardía, para luego disminuir gradualmente su concentración en el medio (308). Más aún, los ensayos de actividad β -galactosidasa reportados han sido realizados a partir de cultivos de *Salmonella* saturados que fueron diluidos $1/100$ en medio fresco LB y crecidos por 4 hs (304).

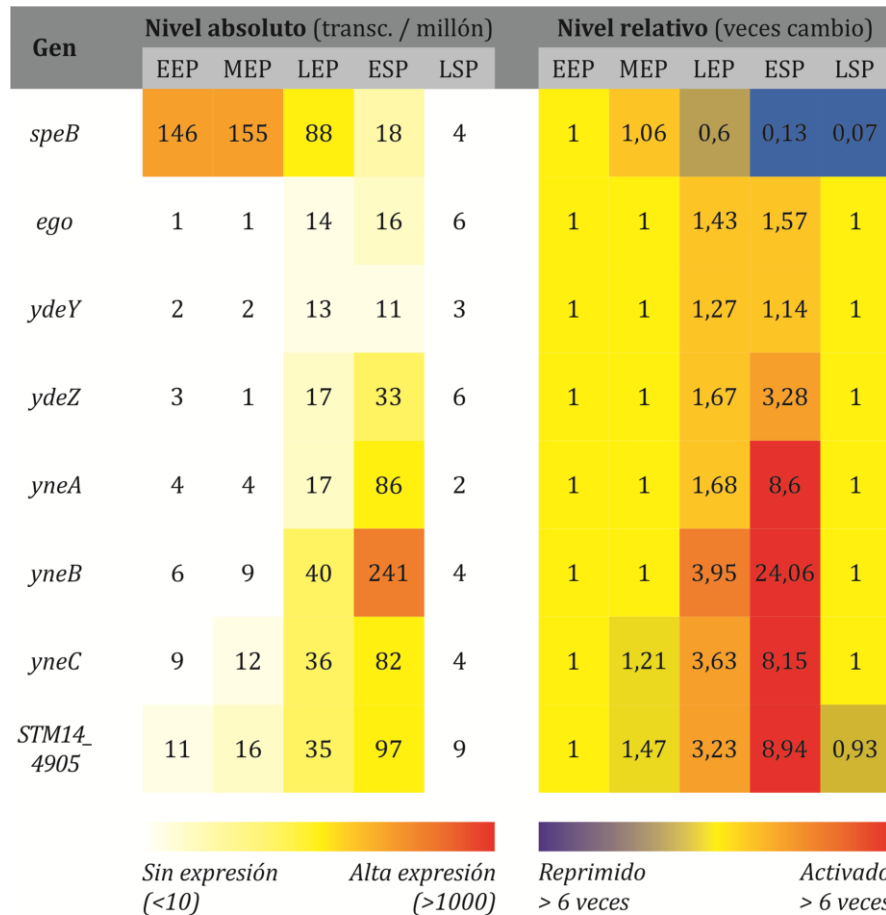


FIGURA R&D.II.10: Patrón de expresión del gen *speB* y del operón *lsr*. Datos obtenidos a partir del programa online SalCom (<http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom.pl>). Se muestran los valores en nivel absoluto (transcriptos por millón, columnas izquierda) y en nivel relativo (veces de cambio, columnas derecha). Las condiciones indicadas en la fila superior corresponden a células crecidas en medio de cultivo LB hasta: EEP, DO₆₀₀ 0,1; MEP, DO₆₀₀ 0,3; LEP, DO₆₀₀ 1; ESP, DO₆₀₀ 2; LSP, DO₆₀₀ 2 seguido de 6 hs adicionales de crecimiento. Los genes indicados codifican para las enzimas: *speB*, agmatinasa; *ego*, proteína de unión a ATP; *ydeY*, *ydeZ*, proteínas canal de membrana; *yneA*, proteína periplásmica de unión a AI-2; *yneB*, aldolasa putativa; *yneC*, proteína degradadora de AI-2; *STM14_4905*, ribulosa fosfato 3-epimerasa putativa.

En base a esta nueva información, se repitieron los ensayos de actividad β-galactosidasa a partir de células crecidas en medio LB hasta DO₆₀₀ 0,3-0,4 (MEP) para el caso de *speB::lacZ*, o hasta DO₆₀₀ 1,8-2,0 (ESP) para el caso de *lsr::lacZ*, tanto en una cepa salvaje como mutante en *phoP*. Los resultados de actividad transcripcional obtenidos en estas condiciones se aprecian en la figura R&D.II.11.

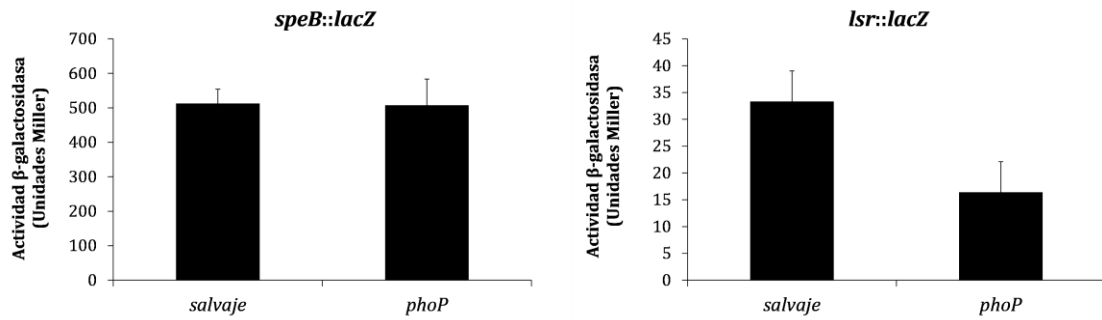


FIGURA R&D.II.11: Regulación por PhoP sobre nuevos blancos identificados. La actividad β-galactosidasa de las fusiones transcripcionales *speB::lacZ* (izquierda) y *lsr::lacZ* (derecha) en entornos génicos salvaje o *phoP* fue medida en células crecidas a 37°C en agitación en medio de cultivo LB hasta DO₆₀₀ 0,3-0,4 (para *speB::lacZ*) o DO₆₀₀ 1,8-2,0 (para *lsr::lacZ*). Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes realizados por duplicado, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En estas nuevas condiciones, tampoco fue posible observar regulación por parte del factor de transcripción PhoP sobre el gen *speB* (figura R&D.II.11, izquierda). Para este gen, será necesario repetir estas medidas a lo largo de toda la curva de crecimiento de la bacteria, a modo de clarificar si existe regulación en otro estadio del crecimiento bacteriano. Además, se ensayarán diversas condiciones de cultivo de la bacteria, como por ejemplo crecimiento en condiciones que simulen aquellas encontradas por *Salmonella* durante el proceso infectivo (p.e. el ambiente intravacuolar), crecimiento en medios de cultivo mínimo, a distintos pH y temperaturas, o frente a la presencia de otras fuentes de carbono y nitrógeno, entre otros. En contraste, al analizar la actividad transcripcional del operón *lsr* cuando las bacterias se encuentran en fase exponencial de crecimiento, se observa una inhibición de un 50% en la actividad β-galactosidasa cuando la proteína reguladora PhoP no está presente, indicando que la misma actúa como activador del operón de *quorum sensing* en las condiciones evaluadas (figura R&D.II.11, derecha).

Finalmente, cabe mencionar que a futuro se estudiará la actividad transcripcional de estos genes mediante RT-PCR semicuantitativa, para reafirmar los resultados obtenidos mediante las medidas de actividad β-galactosidasa presentadas. Además, se evaluará la actividad transcripcional de aquellos genes u operones que presentaron sitios de unión putativos al regulador de respuesta PhoP pero no fueron estudiados hasta este momento, y se realizará el análisis bioinformático sobre los

genes u operones de aquellos procesos metabólicos o celulares que se vieron afectados, pero los cuales no fueron evaluados hasta este punto.

4. b. Análisis de los niveles de expresión proteica de los blancos de regulación por PhoP

Si bien es necesario tener más evidencias para afirmar la existencia de regulación a nivel transcripcional por parte del regulador de respuesta PhoP, se comenzó a analizar a nivel fenotípico el efecto de la regulación por parte del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. En una primera aproximación, se procedió a estudiar la expresión de los productos codificados por estos putativos genes PhoP-regulados. Para ello, se decidió en forma conjunta con el grupo del Dr. Francisco García-del Portillo realizar el etiquetado génico sobre *speB*, *ast* y *lsr* (tarea realizada en el Laboratorio de Patógenos Bacterianos Intracelulares por la Mg. Gadea Rico), de manera que las proteínas que codifican se expresen ahora unidas a un *tag* 3xFLAG que permita su detección con anticuerpos específicos. En la construcción de estas fusiones se mantuvieron intactas las proteínas expresadas, y la adición de la etiqueta se realizó en el extremo C-terminal de las mismas. Para el caso de los operones *ast* y *lsr*, el etiquetado se realizó sobre las proteínas ubicadas al final de la unidad transcripcional (*astE* y STM14_4905, respectivamente)

Las cepas etiquetadas, tanto en fondo salvaje como mutante en *phoP*, fueron procesadas como se describe en la sección M&M.13.a. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes (PAGE-SDS), ajustando los volúmenes sembrados de modo de estandarizar respecto a la densidad óptica a 600 nm de los cultivos de partida (sección M&M.16). Luego de terminada la corrida electroforética, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó la inmunodetección con anticuerpos específicos anti-FLAG o anti-MBP-PhoQ_{cit} según lo explicado en la sección M&M.17. En cada ensayo independiente, luego del revelado, se realizó una densitometría para determinar la intensidad de señal de las bandas en cada fondo genético, tanto para la proteína etiquetada como para el control de carga MBP. En base a estos datos se estandarizó, dentro de cada entorno genético, la señal obtenida para la proteína etiquetada respecto a la señal obtenida para el control de carga. Con

los resultados de 2 ensayos independientes se realizaron los promedios y las desviaciones estándar, y los mismos se graficaron en función de cada proteína en cada uno de los fondos génicos. Los valores se relativizaron tomando como 100% el valor obtenido para cada proteína en el entorno salvaje.

En la figura R&D.II.12 se muestra uno de los Western-blot obtenidos junto con la densitometría proveniente del análisis de 2 ensayos independientes. Para el caso de la proteína AstE, en ninguno de los ensayos realizados fue posible obtener señal trabajando en las condiciones optimizadas para poder detectar las demás proteínas. Esto es consistente con la ausencia de actividad β -galactosidasa de las cepas portando la fusión transcripcional *ast::lacZ*, sugiriendo que es necesario poner a punto las condiciones de cultivo para lograr una inducción en la expresión del operón.

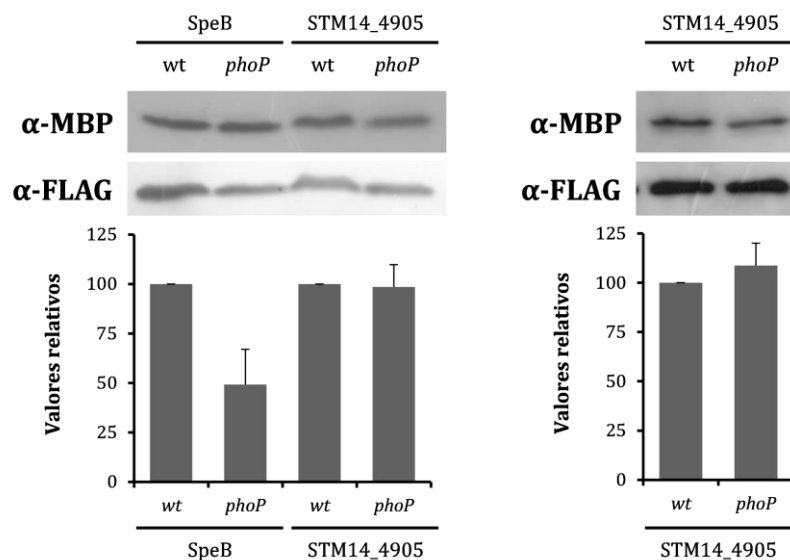


FIGURA R&D.II.12: Niveles de expresión de las proteínas SpeB y STM14_4905. Las células de *S. Typhimurium* 14028s salvaje (wt) o *phoP* conteniendo las fusiones traduccionales a 3xFLAG de las proteínas SpeB y STM14_4905 fueron crecidas en medio de cultivo LB a 37°C con agitación hasta fase estacionaria (izquierda) o fase exponencial (derecha). Las muestras fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-MBP-PhoQ_{cit} (imagen superior) o anti-FLAG (imagen central). Los niveles de expresión proteica de MBP y SpeB o STM14_4905 en cada entorno génico fueron determinados por densitometría (como se explica en el texto), y la relación entre la señal obtenida para las proteínas etiquetadas y la obtenida para el control de carga MBP fue graficada (gráfico inferior), tomando como 100% los valores obtenidos para las proteínas en entorno salvaje. Los resultados mostrados corresponden al promedio y las barras de error a la desviación estándar de dos ensayos independientes.

Como se observa en la figura superior, hay una reducción del 50% en los niveles proteicos de SpeB cuando la expresión se analiza en un entorno mutante *phoP*

respecto a la cepa salvaje. Adicionalmente a los ensayos en diversas condiciones y medios de cultivo y a la validación de los resultados mediante medidas transcripcionales por RT-PCR semicuantitativa que ya hemos mencionado, se planea confirmar la regulación por parte de la proteína PhoP mediante evaluación de la unión de este regulador de respuesta a la región promotora del gen *speB*, tanto mediante experimentos de retardo de la movilidad electroforética en gel como por ensayos de protección del ADN a la DNasa I.

Como se mencionó previamente, SpeB cataliza la formación de putrescina a partir de agmatina, en la biosíntesis de poliaminas como putrescina y espermidina. Se ha reportado que una mutante *spe* tiene, comparada con la cepa salvaje, significativamente reducida su habilidad para invadir y sobrevivir en células epiteliales. La invasión y replicación intracelular de estas mutantes *spe* es completamente restaurada por crecimiento de las bacterias en presencia de putrescina y espermidina previamente a la infección, indicando que estas poliaminas funcionan como señales que preparan a *S. Typhimurium* para la invasión y supervivencia intracelular. Por otra parte, la expresión de los genes de los mayores *loci* de virulencia SPI-1 y SPI-2 responde a las poliaminas exógenas y está reducida en la mutante *spe* (302).

Durante el curso de la infección, *Salmonella* atraviesa distintos ambientes que poseen condiciones cambiantes. Por ejemplo, la bacteria se encuentra con concentraciones milimolares de cationes divalentes y con ácidos grasos insaturados en el lumen intestinal, señales que se ha demostrado producen una inhibición de la actividad del sistema PhoP/PhoQ (101, 216). Además, podemos hipotetizar que en este escenario existan poliaminas provenientes tanto de la síntesis propia de *Salmonella* como de otros organismos que conforman la flora intestinal normal. Tanto la ausencia de una proteína fosfo-PhoP activa como la presencia de poliaminas en el lumen del intestino pueden ser factores que lleven a la inducción de los genes codificados en la isla de patogénesis 1 y 2, promoviendo la invasión de las células epiteliales por parte de *Salmonella* y preparando a esta bacteria para sobrevivir al ambiente intracelular (323, 324). Una vez dentro de la célula hospedadora, las señales presentes en el ambiente intravacuolar promoverían la activación del sistema, con la consecuente fosforilación del regulador de respuesta PhoP. Entonces, la proteína fosfo-PhoP activa promovería la transcripción del gen *speB*, con la

concomitante inducción en la expresión de esta proteína. Luego, la agmatinasa SpeB catalizaría la formación de putrescina, la cual (por mecanismos que todavía no se han clarificado) induciría la expresión de los genes presentes en SPI-2. Más aún, en nuestros ensayos de microarreglos se ha visto que existe una activación dependiente de PhoP de la expresión del gen *argT*, que codifica para una proteína transportadora de arginina, del gen *argD*, que sintetiza una de las enzimas involucradas en la síntesis de arginina a partir de glutamato, y del operón *potFGHI*, que expresa un sistema de captación de putrescina. La arginina es el aminoácido precursor en la formación de agmatina por parte de SpeA, y éste es el metabolito de partida para la generación de putrescina, reacción catalizada por SpeB. De esta manera, el regulador de respuesta PhoP estaría actuando de manera coordinada sobre diversos procesos del transporte y metabolismo de poliaminas, ya sea tanto sobre la captación de más putrescina por inducción en la expresión del transportador específico como favoreciendo la síntesis y captación de arginina para ser usada como sustrato, y promoviendo la síntesis de putrescina a partir de ella.

Por último, tanto putrescina como espermidina son aminas catiónicas capaces de unir moléculas ácidas, como ADN y ARN, en las células. En *E. coli* casi el 90% de la espermidina y el 50% de la putrescina está asociada con ARN, y se ha demostrado que la unión de estas poliaminas al ARNm altera su estructura. Esta influencia en la estructura de los ARNm ha mostrado en *E. coli* afectar la eficiencia de traducción de blancos específicos, incluyendo importantes reguladores. Existe la posibilidad de que un mecanismo regulatorio similar, dependiente de poliaminas, opere en *Salmonella* (302).

En base a lo previamente expuesto, la vía de biosíntesis de putrescina sería un nuevo blanco de acción del regulador de respuesta PhoP, adicionando un nuevo mecanismo de regulación de la virulencia por parte del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*.

Finalmente, analizando los resultados obtenidos para el caso de STM14_4905 (figura R&D.II.12), no se observan diferencias en los niveles de expresión proteica entre un fondo salvaje y uno mutante en *phoP*. Es más, el análisis de los niveles de expresión en fase exponencial de crecimiento, donde hemos demostrado mediante

medidas de actividad β -galactosidasa que la expresión se encuentra inducida en presencia de la proteína PhoP, tampoco arrojó diferencias significativas entre la cepa salvaje y la cepa mutante en el regulador de respuesta. Una explicación para estos resultados proviene del hecho que el agregado de la etiqueta de 3xFLAG ha sido realizado en el extremo 3' del operón *lsr*, fusionada al último gen del mismo, mientras que la cepa reportera transcripcional fue construida reemplazando el segundo gen de este operón, *lsrC*, por el gen *lacZ*. Una primera consecuencia de esto es que la primera de las cepas mantiene el operón *lsr* intacto, mientras que la segunda resulta en una mutante polar Δ *lsrCDBFGE* con reducida o nula capacidad de captar las moléculas de AI-2, fosforilarlas y desreprimir el efecto por parte del represor LsrR. Entonces, en el caso de los resultados de actividad transcripcional estamos observando sólo el efecto debido a la activación por parte de la proteína PhoP (ya que LsrR se mantendría unido y reprimiendo la expresión, debido a la ausencia de fosfo-AI-2), mientras que en el caso de la proteína etiquetada estamos analizando el efecto en presencia del represor LsrR inactivo.

Para salvar estas diferencias, nos proponemos complementar estos resultados con diversos experimentos pendientes de realización. En el caso de la regulación transcripcional, se verificará mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa que exista activación por parte de la proteína PhoP sobre la expresión de varios genes ubicados a lo largo de todo el transcripto correspondiente al operón *lsr*. Previamente, ha sido reportado que una cepa de *S. Typhimurium* conteniendo una fusión *lsrE::lacZ* posee menores niveles de actividad que aquella obtenida cuando el gen reportero se ubica en los primeros genes del operón, hipotetizando que esta disminución es debida a una menor transcripción porque *lsrE* es el gen más distal respecto al promotor del operón *lsr* (304). Este resultado también es verificado por los datos aportados por el programa *online* SalCom (figura R&D.II.10), donde se observa que existe un patrón de expresión que es diferencial a lo largo del operón *lsr*: existen niveles de expresión más altos en los genes ubicados en el centro del operón respecto a aquellos ubicados al inicio o al final. Es posible especular también que esta ubicación más distal del gen *lsrE* no vea afectada su expresión por la presencia o no del regulador de respuesta PhoP, hipótesis que podrá resolverse al completar el análisis de la regulación transcripcional de este operón. Además, será interesante evaluar el perfil de expresión de estos genes en otros

entornos génicos, como por ejemplo una cepa simple mutante *lsrR*, con una activación constitutiva del operón, y una cepa doble mutante *lsrR phoP*, que tendría niveles de actividad transcripcional intermedios entre un entorno salvaje y *lsrR*.

En cuanto al análisis de expresión proteica, la fusión traduccional mantiene el operón *lsr* intacto con la consecuente activación del mismo en presencia de AI-2, por lo que podríamos hipotetizar que la inducción en la expresión de los genes en ausencia de su represor no permita la observación de diferencias significativas en la regulación por parte de PhoP. En este sentido, se evaluará realizar construcciones con etiqueta de 3xFLAG sobre otras proteínas codificadas por los genes del operón, o el estudio de los niveles de expresión de las mismas mediante el uso de anticuerpos específicos. También será interesante realizar estas medidas en entornos génicos *lsrR* y *lsrR phoP*, para comparar con las medidas transcripcionales previamente descritas.

Finalmente, si bien no se detectaron diferencias a nivel de expresión de la proteína STM14_4905, no descartamos que exista regulación por parte de PhoP sobre el operón responsable de *quorum sensing* en *Salmonella*, y que la expresión diferencial que observamos sobre los genes del operón en los ensayos de microarreglos, y que verificamos mediante medidas de actividad β -galactosidasa, no se traslade a diferencias en aquellos genes ubicados al final del mismo, como STM14_4905. Por otra parte, es posible que exista una regulación a nivel transcripcional en presencia de PhoP, pero que existan otros mecanismos post-transcripcionales que compensen los niveles proteicos de STM14_4905, u otras proteínas codificadas en el operón *lsr*, en un fondo mutante en aquel regulador, y por ello no detectemos diferencias en los niveles de expresión de la misma entre un entorno salvaje y un fondo mutante en el regulador de respuesta PhoP.

R&D. II. 5. Conclusiones finales

La tecnología de microarreglos de ADN permite la obtención de una gran cantidad de información respecto al perfil de expresión génica global de un microorganismo crecido bajo diversas condiciones. En este capítulo, se presentaron los resultados provenientes de los ensayos de microarreglos realizados gracias a la colaboración con el Laboratorio de Patógenos Bacterianos Intracelulares, bajo la

dirección del Dr. Francisco García-del Portillo. Mediante estos estudios, se obtuvo el patrón de expresión de cepas de *Salmonella* Typhimurium salvaje y mutante en el regulador de respuesta PhoP, crecidas hasta fase estacionaria en medio de cultivo LB en ausencia o presencia de ácido linoleico. En particular, el análisis realizado en esta oportunidad se focalizó en la búsqueda de nuevos genes que se encuentren activados por la proteína PhoP y que sean reprimidos por la presencia del ácido graso insaturado en el medio de cultivo. Esto llevo a la identificación de más de 200 genes que presentaban este patrón de expresión, algunos que ya han sido caracterizados como modulados por el regulador de respuesta, y otros que podrían ser nuevos blancos de regulación por parte de PhoP. Además, se observó que la gran mayoría de estos genes cuya expresión se encontraba modificada codificaban proteínas o enzimas que permitieron agruparlos en procesos metabólicos y celulares comunes, como ser el metabolismo central del carbono, el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo de poliaminas, el proceso de división celular, la biosíntesis y modificación de LPS y glicerofosfolípidos, el sistema de sensado de la densidad de población celular o *quorum sensing*, la formación del ribosoma, la cadena de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, y la homeostasis de Mg^{2+} , por mencionar algunos de ellos.

En una primera aproximación, realizamos un análisis bioinformático tendiente a encontrar posibles sitios consenso de unión al regulador PhoP en aquellos genes identificados que están involucrados en las vías de transporte y metabolismo de aminoácidos, en el transporte y metabolismo de poliaminas, y en el sistema de *quorum sensing*. El análisis llevó a la identificación de cajas putativas de unión a PhoP en los genes *ntrC*, *nac*, *argD*, *argT* y *speB*, así como también en los operones *astCADBE*, *glt*, *adi*, *gabDTPC*, *potFGHI* y *lsrACDBFGE*. Profundizando el análisis de la regulación transcripcional sobre estos genes, se construyeron las fusiones *ast::lacZ*, *speB::lacZ* y *lsr::lacZ*, y se evaluó la actividad β -galactosidasa de las mismas tanto en una cepa de *S. Typhimurium* salvaje como *phoP*. Desafortunadamente, no fue posible obtener expresión de la fusión *ast::lacZ* en las condiciones de cultivo evaluadas, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de aquellas condiciones de crecimiento óptimas para la expresión de este operón.

Por otra parte, no se observó expresión diferencial del gen *speB* entre los entornos salvaje y *phoP*, tanto al evaluar la actividad transcripcional en fase

exponencial como estacionaria de crecimiento. Como se mencionó previamente, también será necesario estudiar otras condiciones de cultivo de esta cepa para verificar la regulación por parte de PhoP sobre el gen *speB*. Sin embargo, al analizar los niveles de expresión de la proteína SpeB, encontramos que se encontraban disminuidos en un 50% en ausencia del regulador transcripcional PhoP, lo que indicaría que el mismo está actuando como un activador sobre la expresión de este gen. Si bien esto sería congruente con lo esperado de acuerdo a los resultados del ensayo de microarreglos, es necesario verificar la regulación a nivel transcripcional sobre *speB* y demostrar la unión del regulador de respuesta a las regiones consenso para poder concluir que la síntesis de poliaminas es un nuevo blanco de regulación por parte del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.

Por último, fue posible verificar la activación por parte del regulador de respuesta PhoP sobre la expresión del operón que sintetiza las proteínas involucradas en el transporte del autoinductor-2, molécula señalizadora del mecanismo de *quorum sensing* bacteriano, aunque es necesario complementar estos resultados con medidas de la actividad transcripcional de distintos genes ubicados a lo largo de todo el transcripto del operón *lsr*. A pesar de esta evidencia de regulación a nivel transcripcional por parte del regulador de respuesta PhoP, no fue posible observar este efecto sobre los niveles de expresión proteica. Esta diferencia respecto a los resultados de la regulación transcripcional fue discutida oportunamente, y puede ser atribuida a los distintos fondos genéticos en los cuales fueron realizadas estas medidas (*lsr* deletado en las medidas transcripcionales vs *lsr* intacto en las medidas de expresión proteica). Estas diferencias se resolverán evaluando los niveles de expresión de las demás proteínas codificadas en el operón, no sólo de aquella ubicada al final del mismo. En este caso, también queda pendiente la demostración de la unión de la proteína PhoP a las secuencia de ADN del operón *lsr*, mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética y de protección a la DNasa.

Finalmente, debemos mencionar que un estudio de los niveles de expresión proteica de cepas de *Salmonella* Typhimurium salvaje y mutante en LuxS (la enzima que produce el clivaje de S-ribosilhomocisteína en homocisteína y AI-2), realizado mediante ensayos de proteómica basado en electroforesis en dos dimensiones acoplado a espectrometría de masas (MALDI-MS), reveló que los niveles de PhoP se encontraban aumentados en presencia de AI-2 o de una proteína LuxS funcional. Los

autores, entonces, sugieren que el autoinductor-2 estaría involucrado en modular la expresión del regulador de respuesta PhoP en *Salmonella Typhimurium* (325). Teniendo en cuenta este antecedente y los resultados hasta aquí presentados, podemos hipotetizar un panorama global en el cuál las moléculas de AI-2 (sintetizadas por la propia bacteria o provenientes del medio extracelular a partir de la síntesis realizada por otras bacterias) incrementarían los niveles de PhoP intracelular, ya sea por inducción de la expresión o por disminución de la degradación. Esto llevaría al concomitante aumento de la expresión de los genes del operón *lsr*, aumentando la síntesis de las proteínas que forman el transportador y la captación de moléculas de AI-2, las cuales luego de ser fosforiladas por LsrK desreprimen la expresión del operón *lsr* por inactivación del represor Lsr, generando una retroalimentación positiva sobre la expresión del mismo. En resumen, estos resultados nos permiten especular que el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ podría estar involucrado en la coordinación entre la respuesta de *Salmonella* frente a la variación en la densidad de población celular y la expresión de determinantes esenciales para la virulencia de esta bacteria.

CAPÍTULO III

**La proteína sensora PhoQ es
modificada post-traduccionalmente
en presencia de ácido linoleico**

En el primer capítulo de este trabajo de tesis se han presentado los resultados que permitieron establecer la inhibición por parte de ácidos grasos insaturados sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Este sistema de transducción de señales esta compuesto por la proteína anclada en membrana interna PhoQ, esquematizada en la figura R&D.III.1, y el regulador de respuesta citoplásmico PhoP. Además, se ha logrado determinar que el blanco de acción específico de los mismos es la actividad de autofosforilación (actividad autoquinasa) de la proteína sensora PhoQ. Para realizar estos ensayos de actividad autoquinasa, las proteínas PhoQ o EnvZ fueron expresadas a partir de un plásmido inducible por IPTG en la cepa de *Salmonella* Typhimurium 14028s crecida en presencia de los diversos LCUFAs en el medio de cultivo. Posteriormente, se realizaron preparaciones de vesículas de membrana interna enriquecidas en la proteína sensora, las cuáles fueron utilizadas para los ensayo de autofosforilación y para los controles de expresión mediante Western-blot de PhoQ y EnvZ.

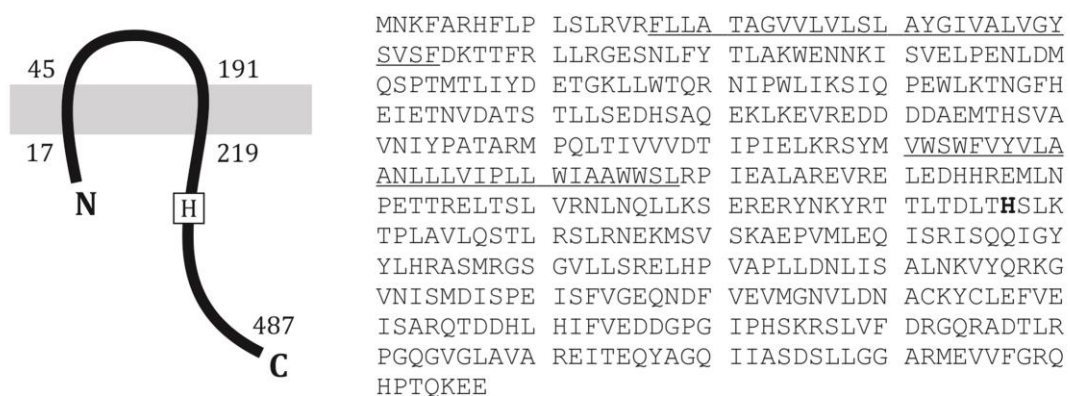


FIGURA R&D.III.1: La proteína sensora PhoQ de *Salmonella enterica*. Izquierda: diagrama esquemático de la estructura de la proteína PhoQ, indicando el número de aminoácido con el que comienza cada porción: transmembrana 1, región sensora, transmembrana 2 y porción citoplásmica. Además, se detalla la ubicación de la histidina 277 (H), residuo aceptor del fosfato en la reacción de autofosforilación. Derecha: secuencia aminoacídica de la proteína PhoQ. Se destacan con subrayado las secuencias correspondientes a las regiones transmembrana 1 y 2, y en negrita la histidina 277.

En todos esos ensayos de Western-blot, para las preparaciones de membranas realizadas a partir de cultivos de *Salmonella* crecidas en ácido linoleico (C18:2), se observan una o más bandas adicionales que reaccionan contra los anticuerpos anti-PhoQ_{cit} y que migran por encima de la señal correspondiente a PhoQ, como se muestra en la figura R&D.III.2. A partir de este momento, denominaremos a estas especies de PhoQ como PhoQ(+) “nativa” y “modificada”, en contraposición a la

especie que se observa al crecer las bacterias sin agregado de C18:2 en el medio de cultivo, que nombraremos como PhoQ(-).

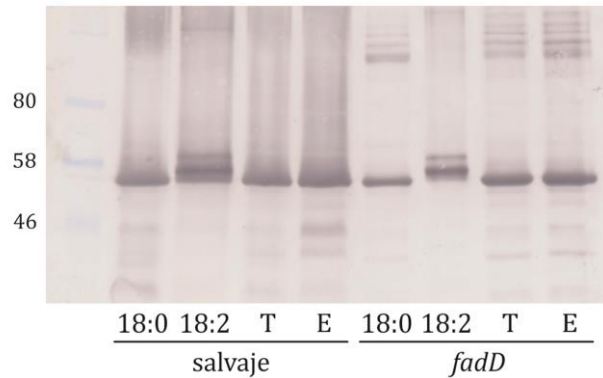


FIGURA R&D.III.2: La presencia de C18:2 en el medio de cultivo provoca la aparición de bandas adicionales que reaccionan con anticuerpos anti-PhoQ. Las células de *S. Typhimurium* salvaje o *fadD* fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de los ácidos grasos esteárico (18:0) o linoleico (18:2), o la cantidad equivalente de los solubilizantes de los mismos, tergitol (T) o etanol (E), respectivamente. Las muestras provenientes de membranas internas conteniendo PhoQ fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit}. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa). La banda correspondiente a la especie de PhoQ “nativa” migra ligeramente por debajo del marcado de peso molecular de 58 kDa, mientras que PhoQ “modificada” lo hace ligeramente por encima de este marcador.

El peso molecular predicho para la proteína PhoQ de *Salmonella Typhimurium* es de 55 kDa, y a partir de las imágenes de los Western-blot se ha calculado una diferencia de peso molecular entre estas dos bandas de aproximadamente 4,7 kDa, lo que implicaría que la forma PhoQ “modificada” tendría un peso molecular estimativo de 59,7 kDa. Como muestra la figura, este resultado también se obtiene al realizar el mismo análisis en un entorno mutante en *fadD*, el gen que codifica para la enzima responsable de la captación de ácidos grasos desde el periplasma, con la concomitante traslocación al interior celular y activación con la coenzimaA (CoA). Este resultado no se detectó al crecer la cepa que sobreexpresa PhoQ en otros ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, ni para la cepa que sobreexpresa la proteína EnvZ en ninguna de las condiciones ensayadas, por lo que podemos establecer que se trata de un efecto específico sobre la proteína PhoQ al crecer las cepas de *Salmonella Typhimurium* en presencia de C18:2.

Este resultado nos plantea la incógnita de la existencia de otras proteínas que estarían interactuando con PhoQ cuando hay presencia de C18:2 en el medio de cultivo, o si dicha movilidad alterada es el resultado de una modificación post-

traduccionales de PhoQ, y en última instancia, de que proteína(s) o modificación se trata. A lo largo de este capítulo se describirán los resultados obtenidos luego de aplicar diversas estrategias con el objeto de dilucidar la naturaleza de esta modificación.

R&D. III. 1. Análisis de la banda adicional de PhoQ mediante experimentos de espectrometría de masa (MS)

Para resolver la situación previamente planteada, se decidió como primera aproximación realizar una purificación de la proteína sensora PhoQ, para luego separar las especies resultantes mediante geles de poliacrilamida y poder escindir las bandas en forma individual a partir de los mismos, las cuales serán finalmente analizadas mediante espectrometría de masa (MS).

La MS ha sido el método elegido para dilucidar modificaciones post-traduccionales (PTMs) en la química de proteínas. La MS juega un rol crucial en los estudios de proteómica dado que es el único método con la sensibilidad, precisión, reproducibilidad y velocidad necesarias para identificar proteínas desconocidas y caracterizar PTMs. La MS se basa en la producción de iones en una fase gaseosa que permita la determinación de la masa molecular de los analitos. Un diagrama simplificado del procedimiento se muestra en la figura R&D.III.3. La muestra debe ser introducida en la fuente de iones del instrumento, donde las moléculas son ionizadas. Los iones son luego extraídos a la región analizadora, donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) y después detectados (326).

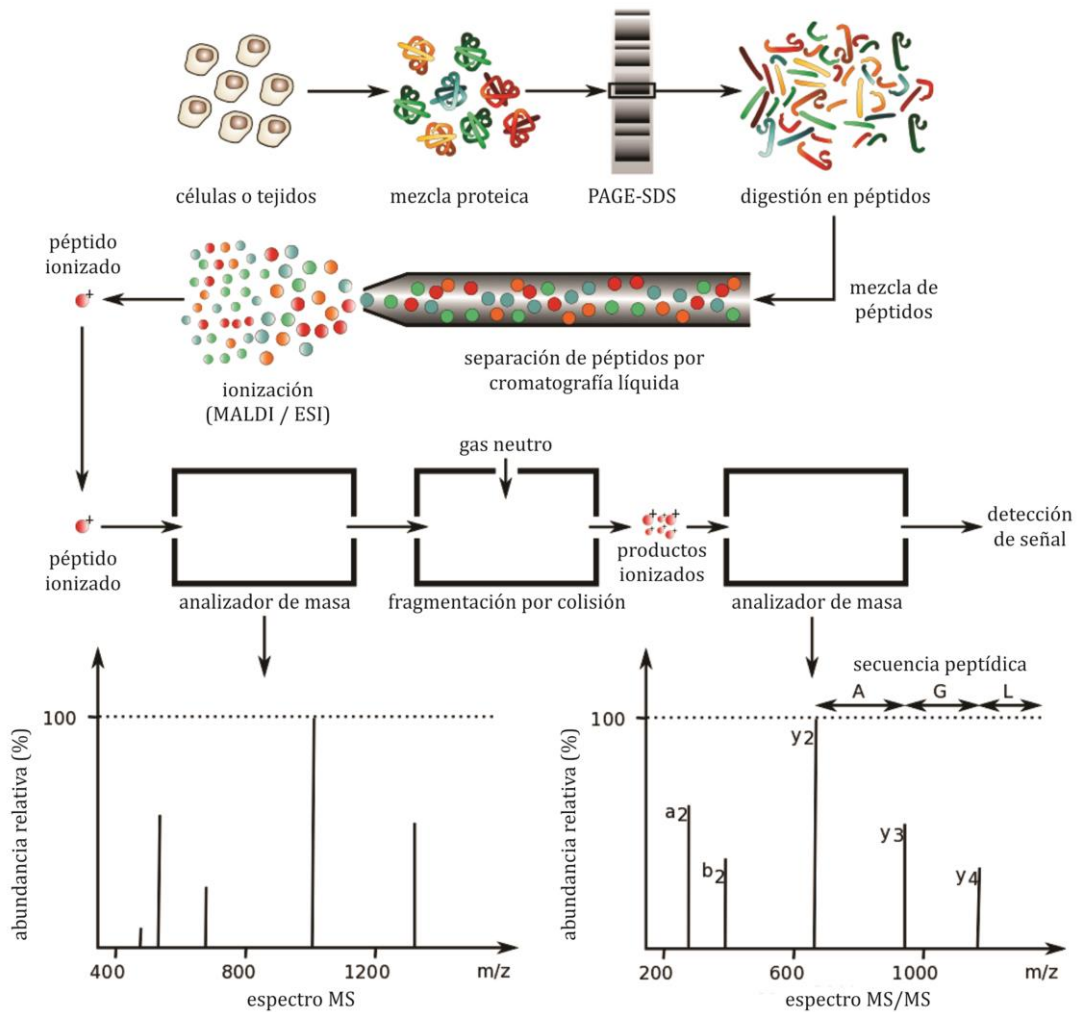


FIGURA R&D.III.3: Diagrama del procedimiento de análisis de muestras por espectrometría de masa (MS). Se muestra un esquema de los pasos que involucra el proceso de detección e identificación de proteínas por MS. Brevemente, la mezcla proteica proveniente de un extracto celular o de fracciones purificadas por cromatografía es separada en geles de poliacrilamida, a partir de los cuales se escinden las bandas y se digieren con enzimas proteolíticas. Esta mezcla de péptidos es separada por cromatografía líquida o inyectada directamente en el espectrómetro de masas, para obtener información respecto a la masa de los péptidos (espectros de MS) e identificar la(s) proteína(s) presentes en la muestra. Adicionalmente, es posible realizar un segundo análisis secuencial, a partir de los péptidos provenientes del primero que han sido fragmentados por colisión con un gas inerte, para determinar la composición aminoacídica de los péptidos (espectros de MS/MS).

Los espectrómetros de masa pueden ser clasificados de acuerdo a su sistema de ionización, un componente esencial que define el rango mensurable de masa, la sensibilidad y la resolución. Las fuentes de ionización más difundidas son la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Durante la ESI, la muestra es disuelta en un solvente polar volátil y bombeada a través de un capilar angosto de acero inoxidable. Un voltaje alto es aplicado a la punta del capilar dentro de la fuente de ionización; la muestra que sale por la punta del capilar es dispersada en un aerosol de gotitas altamente cargadas.

Las gotitas cargadas disminuyen su tamaño debido a la evaporación del solvente, la cual es asistida por un flujo de gas nitrógeno tibio. Eventualmente, los iones cargados de la muestra que están libres de solvente son liberados de las gotitas y pasan al analizador del espectrómetro de masas. Por su parte, el MALDI-MS se basa en el bombardeo de las moléculas de la muestra con un laser, para inducir la ionización de la misma. La muestra es pre-mezclada en un plato de acero inoxidable con una matriz de alta absorción. Una vez excitada, la matriz es capaz de transferir energía y protones a la muestra. Luego de secarse, las moléculas de la matriz cristalizan y se forman cristales sólidos conformados por muestra y matriz, sobre los cuales se dispara un laser. La absorción de la energía del láser por las moléculas de la matriz resulta en un evento de desorción. Esta energía es utilizada para transferir un protón desde la matriz al analito, resultando en la formación de los iones de la muestra (326).

Los analizadores de masa pueden incorporar cuadrupolos (Q), trampas iónicas (IT), tiempo de vuelo (TOF), o una combinación de éstos en “instrumentos híbridos” para obtener buena resolución y sensibilidad. La fuente ESI es usualmente empleada con analizadores cuadrupolos y de trampa de iones; mientras que los analizadores tipo TOF generalmente se usan en combinación con fuentes de ionización MALDI. Las ventajas de los espectrómetros de masa de trampa de iones incluyen el tamaño compacto, y la habilidad de atrapar y acumular iones para incrementar la relación señal/ruido. En los espectrómetros de masa tipo TOF, los iones creados por ionización MALDI ingresan a un tubo que se encuentra a alto vacío. Todos los iones que ingresan al tubo TOF tienen una energía cinética fija que es proporcional al voltaje aplicado y a la carga. Cuanto mayor la masa del ión, menor es su velocidad y mayor tiempo le toma hasta alcanzar el detector. Los iones de diferente masa pueden ser separados basados en sus diferentes velocidades en el tubo TOF. Sus valores m/z son determinados por medición del tiempo que le toma a cada ión viajar a través del tubo hasta el detector (326).

Las fuentes de ionización MALDI y ESI se conocen como métodos de ionización suaves porque la muestra es ionizada por agregado o remoción de un protón, con poca energía remanente para causar la fragmentación de los péptidos ionizados. Sin embargo, la espectrometría de masa en tándem (MS/MS) requiere la fragmentación dentro del MS de los péptidos ionizados para obtener información

estructural acerca de la muestra (p.e. su composición de aminoácidos). La espectrometría MS/MS requiere dos etapas de análisis de masa: la primera para pre-seleccionar un péptido ionizado, y la segunda para analizar los fragmentos de este péptido. Estos fragmentos son generados utilizando una celda de colisión que contiene un gas inerte, como argón o xenón, que produce la fragmentación de los péptidos ionizados en sus unidades estructurales (326).

La identificación de proteínas por MS puede realizarse tanto a partir de muestras separadas por PAGE-SDS y digeridas, como cortadas directamente utilizando procedimientos enzimáticos en la aproximación denominada “*bottom-up*”. Luego de la separación electroforética, el gel de poliacrilamida es teñido con colorante Coomassie coloidal, y los componentes proteicos son escindidos del gel. Estos son tratados con un agente reductor y alquilados con iodoacetamida para bloquear irreversiblemente los residuos de cisteínas, y luego digeridos con tripsina. La mezcla de péptidos resultante es extraída del gel y analizada directamente usando MS por MALDI-TOF (326).

La identificación de diferentes proteínas es llevada a cabo utilizando el procedimiento del perfil de las masas peptídicas (*peptide mass fingerprinting*). Este procedimiento utiliza los valores de masa, junto con información adicional como la proteasa usada para la hidrólisis. Esta información es introducida en el programa de búsqueda Mascot o similares disponibles en internet, donde los valores de masa experimentales son comparados con aquellos obtenidos a partir de una digestión teórica de todas las proteínas presentes en la base de datos, permitiendo la identificación de la(s) proteína(s) presente en la muestra de partida. De modo alternativo, si el procedimiento de “*peptide mass fingerprinting*” no permite la identificación de la(s) proteína(s), se pueden utilizar métodos que combinen cromatografía líquida con espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS). En estos experimentos, la mezcla de péptidos es fraccionada por HPLC capilar, y las fracciones que eluyen de la columna son directamente introducidas en el ESI-MS para determinar los valores de masa. Los péptidos ionizados serán simultáneamente aislados y fragmentados dentro del MS, produciendo espectros “hijos” a partir de los cuales se puede obtener información sobre la secuencia de los péptidos individuales. Esta información, junto con los valores de masa de los péptidos, es luego usada para

buscar en bases de datos de proteínas, permitiendo la identificación de los componentes proteicos en la muestra (326).

Actualmente, la MS es considerada la tecnología clave para identificar y cuantificar proteínas y PTMs, y para detectar interacciones proteína-proteína. Una de las cuestiones más importantes en el descubrimiento de PTMs es la cobertura de la secuencia proteica lograda. De hecho, la abundancia relativa de las distintas proteínas en la célula plantea dificultades significativas en la identificación y cuantificación de proteínas en general, y de proteínas poco abundantes en particular. Este rango de concentraciones resalta la necesidad de fraccionar y enriquecer las proteínas (p.e. mediante nano-LC), y la importancia de desarrollar métodos rápidos y sensibles. Además, debe considerarse que los analizadores y los métodos de fragmentación para análisis de MS/MS, así como también la discriminación diferencial de péptidos por MALDI y ESI, contribuyen a distintas coberturas de secuencia. En general, la ionización por ESI brinda una ligera mejor cobertura de secuencia proteica (327).

Al seleccionar un espectrómetro de masa para proteómica y detección de PTMs deben considerarse varios parámetros: velocidad de adquisición, poder de resolución, precisión de masa, sensibilidad, rango dinámico y métodos de fragmentación. En la actualidad se considera que un elevado poder resolutivo y la precisión en la determinación de masa son esenciales para el análisis proteómico y de PTMs. Esto limita los instrumentos a tres plataformas de espectrometría de masa en tándem: cuadrupolo tiempo de vuelo (QqTOF), tiempo de vuelo/tiempo de vuelo (TOF/TOF) y trampa iónica/orbitrap (IT/orbitrap) (327).

Por último, la proteómica de alto rendimiento permite la identificación simultánea de miles de péptidos modificados, pero el procesamiento, análisis y presentación de los datos son los aspectos más desafiantes de la proteómica. La caracterización de PTMs a partir de datos de MS/MS involucra una búsqueda exhaustiva, en las bases de datos de proteínas, de todas las combinaciones potenciales de cambio de masa para cada péptido identificado. Varias herramientas son usadas comúnmente para llevar a cabo esta tarea, como por ejemplo Mascot (Matrixscience), Sequest, Maxquant y Paragon. Una evolución importante en los algoritmos de detección de PTMs permite la interpretación de datos experimentales en combinación con sitios predichos o reportados de ocurrencia de PTMs. Sin embargo, es importante notar que la presencia de una secuencia consenso no

equivale necesariamente a la presencia de la modificación. Finalmente, aunque el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas para el análisis a gran escala de PTMs ha permitido un progreso significativo en proteómica y el descubrimiento de PTMs, es necesaria realizar la validación manual para confirmar los datos obtenidos en los experimentos de espectrometría de masa (327).

Entonces, para llevar a cabo estos estudios con el fin de dilucidar la naturaleza de esta banda adicional, se estableció contacto con el Dr. Nichollas Scott, del laboratorio del Dr. Leonard Foster (Centre for High-Throughput Biology, University of British Columbia, Vancouver, Canadá), que se especializa en el análisis de muestras por MS; y también se trabajó en colaboración con el Dr. Germán Rosano (Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario, UNR-CONICET), que realizó estos experimentos en las instalaciones del Instituto Pasteur de Montevideo. En esta sección, se presentarán los resultados de la purificación de la proteína sensora PhoQ y los datos obtenidos a partir del análisis de la misma por MS realizado en ambas locaciones.

1. a. Purificación de la proteína sensora PhoQ unida a un tag de 6xHis

Para facilitar el proceso de purificación, se trabajó con una cepa de *Escherichia coli* que sobreexpresa la proteína PhoQ de *S. Typhimurium* unida a un tag de histidinas en el extremo N-terminal (His-PhoQ). El protocolo llevado a cabo se describe en la sección M&M.14. Brevemente, las células de *E. coli* M15 pREP4 conteniendo el plásmido pQE31::*phoQ* fueron crecidas hasta $DO_{600nm} = 0,5-0,6$ en medio de cultivo LB en presencia de ácido linoleico a concentración final $0,5 \text{ mg/ml}$ o en presencia de etanol en cantidad equivalente a la resultante de adicionar el ácido graso insaturado en su solvente (condición que denominaremos a partir de ahora como “control”). La inducción de la expresión de la proteína recombinante fue realizada por agregado de IPTG a concentración final $0,7 \text{ mM}$, y posterior incubación durante 3 horas a 37°C con agitación. Finalmente, se llevó a cabo la preparación de membrana interna por técnicas de fraccionamiento celular, como se describe en la sección M&M.13.b. Una vez obtenidas las fracciones de membranas enriquecidas en la proteína His-PhoQ, el control de la expresión se realizó mediante ensayo de

Western-blot con anticuerpos anti-His o anti-PhoQ_{cit}, resultado que se muestra en la figura R&D.III.4.

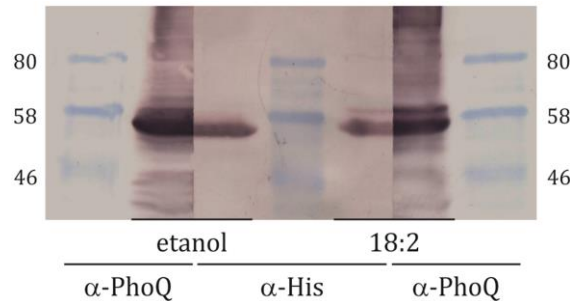


FIGURA R&D.III.4: Control de expresión de la proteína His-PhoQ. Las células de *Escherichia coli* sobreexpresando His-PhoQ fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 ^{mg}/_{ml} de ácido linoleico (18:2) o la cantidad equivalente de etanol. Las muestras provenientes de membranas internas conteniendo PhoQ fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-His o anti-PhoQ_{cit}. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa). La banda correspondiente a la especie de PhoQ “nativa” migra ligeramente por debajo del marcado de peso molecular de 58 kDa, mientras que PhoQ “modificada” lo hace ligeramente por encima de este marcador.

En primer lugar, este resultado nos permite establecer que la proteína PhoQ expresada en una cepa de *E. coli* crecida en presencia de ácido linoleico continua presentándose como una banda doble, por lo que podemos afirmar que esta cepa también posee los mecanismos celulares que producen la modificación post-traducciona, o que también contiene la(s) proteína(s) con las cual(es) PhoQ está interaccionando. Además, se aprecia que ambas bandas reaccionan tanto con los anticuerpos específicos contra PhoQ como con aquellos dirigidos contra el *tag* de histidinas, permitiéndonos confirmar que la banda adicional presente en las muestras obtenidas a partir de células crecidas en presencia de C18:2 es la proteína recombinante His-PhoQ.

Dado que la proteína sensora se encuentra insertada en la membrana bacteriana, es necesario recuperarla en forma soluble para poder proceder con la purificación. Para lograr este objetivo, el tratamiento consistió en resuspender las preparaciones de membrana interna en buffer conformado por Tris 25 mM, NaCl 250 mM y Triton X-100 1%. Esta suspensión se incubó durante 60' en hielo, para luego separar las fracciones soluble (S1) e insoluble por centrifugación durante 40' a 15000 rpm. La fracción insoluble es resuspendida nuevamente en el mismo volumen de buffer (P1) e incubada en hielo durante otros 60', tiempo luego del cual se vuelve a

centrifugar para recuperar una segunda fracción soluble (S2) y un pellet que es nuevamente resuspendido en el mismo volumen (P2). El control del tratamiento de solubilización se realizó mediante Western-blot de cada una de las fracciones utilizando los anticuerpos específicos contra PhoQ, resultado que se muestra en la figura R&D.III.5.

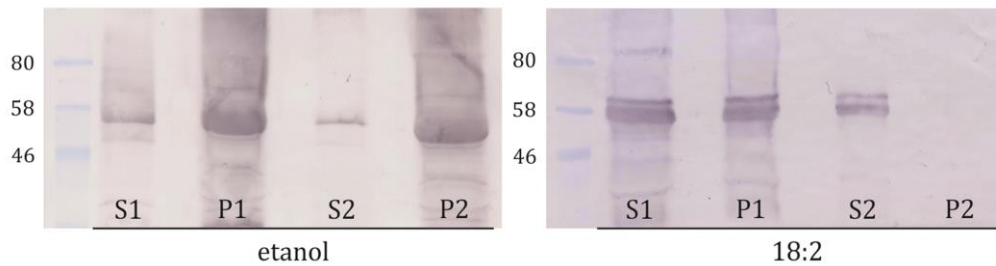


FIGURA R&D.III.5: Control del tratamiento de solubilización de la proteína His-PhoQ. Las fracciones de membrana interna, obtenidas a partir de células de *E. coli* sobreexpresando His-PhoQ crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de C18:2 (derecha) o la cantidad equivalente de etanol (izquierda), fueron sometidas a dos rondas de solubilización con buffer Tris 25 mM, NaCl 250 mM y Tritón X-100 1% según se describe en el texto, obteniéndose en cada ronda una fracción soluble (S1 y S2) y una fracción insoluble (P1 y P2). Las fracciones obtenidas en cada ronda fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit}. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa). La banda correspondiente a la especie de PhoQ “nativa” migra ligeramente por debajo del marcado de peso molecular de 58 kDa, mientras que PhoQ “modificada” lo hace ligeramente por encima de este marcador.

Como puede observarse en la figura R&D.III.5, el tratamiento de solubilización fue más efectivo para el caso de las preparaciones de membrana obtenidas a partir de células crecidas en presencia de C18:2, recuperándose aproximadamente un 50% en la fracción soluble en la primera ronda de solubilización (S1), mientras que la recuperación en la fase soluble fue del 100% al realizar una segunda ronda de tratamiento (S2). La recuperación fue significativamente menor para aquellas preparaciones provenientes de células crecidas en medio control, y subsiguientes rondas de solubilización no mejoraron significativamente la recuperación (no mostrado).

Continuando con el protocolo de preparación de la muestra para el proceso de purificación, se tomaron las fracciones S1 y S2 de cada preparación de membrana, se juntaron, y se diluyeron con el mismo volumen de buffer Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pero sin presencia de Triton X-100, de manera de obtener una concentración final de detergente de 0,5%. Esta muestra, que denominamos como M, se utilizó para el subsiguiente proceso de purificación.

Luego de diversas pruebas para optimizar la purificación de la proteína sensora, finalmente se logró establecer un protocolo por el cual las mismas se obtuvieron con un grado de pureza que permite la escisión de las bandas de manera independiente. El protocolo consiste en la utilización de 500 μ L de resina Ni-NTA agarosa, colocados en el cuerpo de una jeringa sin émbolo con la boquilla orientada hacia abajo, de manera de lograr un flujo de líquido con presión atmosférica. Dado que la proteína recombinante posee un *tag* de histidinas que coordina con el Ni²⁺ presente en la resina, otras proteínas sin etiqueta presentes en el extracto total no interaccionan y se eliminan con los lavados. Además, esto permite su elución por competencia con imidazol agregado al buffer de purificación. El buffer de base utilizado para la purificación está compuesto por Tris 25 mM, NaCl 250 mM y Triton 0,5%, y es referido a partir de ahora como TNT.

El protocolo de purificación mediante cromatografía de afinidad se describe en detalle en la sección M&M.14. De modo resumido, el mismo consiste en equilibrar la resina con 20 volúmenes del buffer de purificación TNT. Luego, se realiza el pasaje de la muestra a través de la resina, recirculando durante 7-10 ciclos a modo de asegurar la unión a la resina de la mayor cantidad posible de proteína recombinante. El volumen obtenido luego de estos pasajes es guardado y rotulado como *flowthrough* (FT). A continuación, la resina es lavada con 10 volúmenes del buffer de purificación TNT, recolectando las fracciones L1, L2 y L3. Posteriormente, se procede a la elución de la proteína recombinante con un gradiente continuo de imidazol, desde 0 a 500 mM en buffer de purificación TNT, recolectándose 20 fracciones de 500 μ L aproximadamente que son rotuladas como E1 a E20. Por último, la elución del resto de las proteínas presentes en la resina es llevada a cabo agregando buffer de purificación TNT con imidazol 500 mM. Una alícuota de las fracciones obtenidas es resuspendida en buffer de muestra, separada por PAGE-SDS en gel de poliacrilamida 12%, transferida a membrana de nitrocelulosa y finalmente revelada con anticuerpos específicos anti-PhoQ. En la figura R&D.III.6 se puede observar el perfil obtenido en la purificación de la proteína sensora expresada en células crecidas en presencia de una cantidad de etanol equivalente a la resultante de adicionar C18:2 en su solvente (imagen superior) o de ácido linoleico (imagen inferior). Para simplificar la escritura, a partir de este momento denominaremos como His-PhoQ(-) y His-PhoQ(+) a la

proteína sensora proveniente de células crecidas en medio de cultivo LB en presencia de etanol o de C18:2, respectivamente.

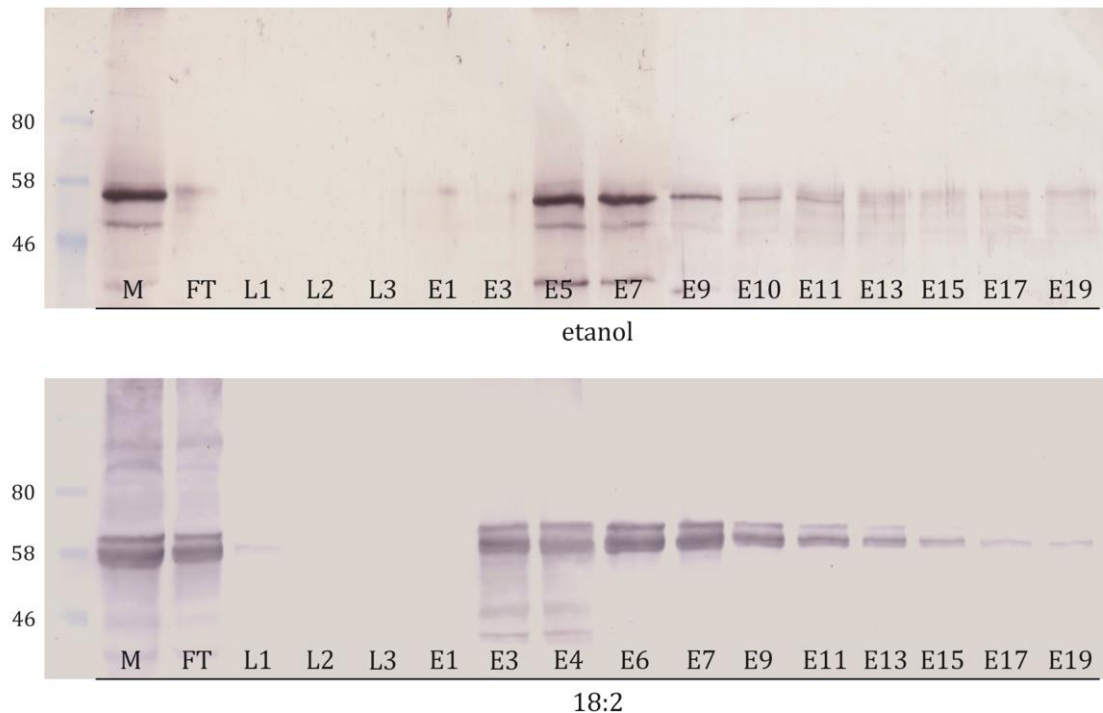


FIGURA R&D.III.6: Purificación de la proteína His-PhoQ mediante cromatografía de afinidad. Se muestran las fracciones colectadas en la purificación de la proteína PhoQ, solubilizada a partir de membranas internas obtenidas de células de *E. coli* crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de C18:2 (imagen inferior) o la cantidad equivalente de etanol (imagen superior). Los nombres de las fracciones indican: M, muestra antes del pasaje por la resina; FT, *flowthrough*, muestra luego del pasaje por la resina; L, lavados; E, eluciones con gradiente continuo desde 0 a 500 mM de imidazol. Las fracciones fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit}. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa). La banda correspondiente a la especie de PhoQ “nativa” migra ligeramente por debajo del marcado de peso molecular de 58 kDa, mientras que PhoQ “modificada” lo hace ligeramente por encima de este marcador.

En primer lugar se realizó un análisis mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra la porción citoplásmica de PhoQ para identificar aquellas fracciones en las cuales la proteína sensora había sido eluida de la columna. Para el caso de la proteína His-PhoQ(-), se observa que la proteína comienza a eluir apenas comienza el gradiente de imidazol, pero que la máxima elución se produce a partir de la fracción E5. Por otra parte, la proteína His-PhoQ(+) eluye a menores concentraciones de imidazol, ya que se detecta señal de la misma a partir de la fracción E3. Una vez identificadas las fracciones que mostraban mayor cantidad de PhoQ, las mismas se separaron en geles de poliacrilamida y posteriormente se tiñeron

con colorante Coomasie Blue para identificar las bandas. Para la proteína His-PhoQ(-) se utilizó para la corrida electroforética la muestra correspondiente a la fracción E5, mientras que para el caso de la proteína His-PhoQ(+) se trabajó con la fracción E6. En la figura R&D.III.7 se visualiza como ejemplo el gel de poliacrilamida obtenido luego de separar electroforéticamente y teñir con Coomasie Blue las muestras correspondientes a la fracción E6 de la proteína His-PhoQ(+).

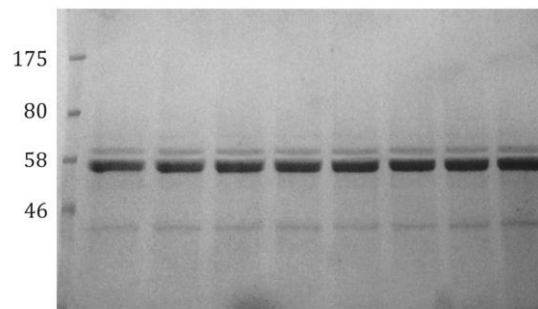


FIGURA R&D.III.7: Fracción E6 de His-PhoQ(+) purificada por cromatografía de afinidad. La fracción E6 obtenida durante el proceso de purificación de His-PhoQ(+) fue separada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, el cual fue luego teñido con Coomasie Blue y finalmente desteñido con solución decolorante como se describe en el texto. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa). La banda correspondiente a la especie de PhoQ “nativa” migra ligeramente por debajo del marcado de peso molecular de 58 kDa, mientras que PhoQ “modificada” lo hace ligeramente por encima de este marcador. Estas dos bandas fueron escindidas de modo individual y colocadas en tubos eppendorf almacenados a -20°C hasta su envío para el análisis por espectrometría de masa (MS)

Como se puede apreciar en el gel de poliacrilamida teñido con Coomasie Blue de la figura R&D.III.7, se logró obtener bandas correspondientes a las especies PhoQ(+) “nativa” y “modificada” con un grado de pureza y de separación electroforética que permite la escisión individual de las mismas a partir del gel.

Dado que la técnica de MS es muy sensible, para llevar a cabo todos estos procedimientos fue necesario tener la precaución de utilizar guantes durante todos los pasos, extremar las condiciones de limpieza de las superficies y materiales usados, y trabajar con soluciones y reactivos, en caso de ser posible, que no hayan tenido uso previo.

1. b. Análisis por espectrometría de masas realizado en Canadá

Para realizar los estudios por espectrometría de masas, en primera instancia establecimos contacto con el Dr. Nichollas Scott, que trabaja en el Centre for

High-Throughput Biology de la Universidad de British Columbia, en Canadá. Entonces, las bandas correspondientes a His-PhoQ(-), His-PhoQ(+) “nativa” y His-PhoQ(+) “modificada” fueron escindidas a partir de gel y enviadas en tubos eppendorf para su posterior procesamiento. Para generar los péptidos a ser separados y analizados se realizó el tratamiento proteolítico con la enzima tripsina, que produce el corte de la secuencia proteica en las posiciones carboxilo de residuos arginina o lisina.

El equipamiento utilizado para llevar a cabo estos experimentos consiste en un sistema de cromatografía líquida (LC) EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific). Las muestras fueron separadas usando cromatografía en fase reversa, e infundidas directamente en el espectrómetro de masas por ionización por electroespray (ESI) utilizando una fuente de iones Nanospray Flex (Thermo Scientific). En este arreglo experimental, el detector es el espectrómetro de masas y no es medida la absorbancia UV de la muestra mientras es separada en el LC, por lo que el cromatograma generado es una medida de la corriente iónica (el número de iones detectados por cada evento de escaneo) detectada por el MS.

Nuestra hipótesis inicial fue que seríamos capaces de identificar la modificación que afectaba la movilidad electroforética de PhoQ por comparación entre los espectros de los péptidos obtenidos de las muestras de PhoQ(+) “nativa” y PhoQ(+) “modificada”. De esta manera, la aparición de una señal en la muestra correspondiente a la especie “modificada” que no era detectada en la especie “nativa” indicaría que ese péptido se encuentra modificado; contrariamente, la desaparición de señal en la muestra “modificada” respecto a la especie “nativa” indicaría que la modificación podría afectar el sitio de corte de tripsina, protegiéndolo del tratamiento enzimático.

En primer lugar, en todas las muestras enviadas, obtenidas a partir de la escisión de las bandas identificadas como especies que reaccionan con los anticuerpos anti-PhoQ_{cit}, fue posible detectar péptidos correspondientes a la proteína PhoQ de *Salmonella* Typhimurium. Esto verificó los resultados observados mediante Western-blot, confirmando que las bandas escindidas de las muestras obtenidas a partir de células crecidas en medio de cultivo LB control o con agregado de C18:2 corresponden a la proteína recombinante His-PhoQ.

En cuanto a la cobertura de secuencia lograda para las distintas especies de la proteína recombinante, fue de un 50,3% y un 47% para las especies de His-PhoQ(+) “nativa” y “modificada”, respectivamente. La secuencia cubierta por los péptidos identificados en estas dos especies se detalla en la Figura R&D.III.8.

MNKFARHFLP LSLRVRFLLA TAGVVLVLSL AYGIVALVGY SVSFDKTTFR LLR**GESNLFY** **TLAKWENNKI**
SVELPENLDM **QSPTMTLIYD** **ETGKLLWTQR** NIPWLIK**SIQ** **PEWLK**TNGFH EIETNVDATS TLLSEHSAQ
EKLKEVREDD DDAEMTHSVA VNIYPATARM **POLTIVVVDI** **IPIELK**RSYM VWSWFVYVLA ANLLVIPLL
WIAAWWSLRP IEALAREVRE LEDHHR**EMLN** **PETTRELTSI** **VRNLNQLLKS** **ERERYNKYRT** **TLTDLTHSLK**
TPLAVLQSTL **RSLRNEKMSV** **SKAEPVMLEQ** **ISRISQOIGY** **YLHRASMRGS** **GVLLSR**ELHP VAPLLDNLIS
ALNKVYQRKG VNISMDSPE ISFVGEQNDF VEVMGNVLDN ACK**YCLEFVE** **ISAR**QTDHHL HIFVEDDGGP
IPHSKRSLVF DRGQR**ADTLR** **PGQVGLAVA** **REITEQYAGO** **IIASDSLGG** **ARMEVVFGRQ** HPTQKEE

FIGURA R&D.III.8: Cobertura de secuencia de PhoQ por péptidos identificados mediante LC-MS en Canadá. Se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína PhoQ. Se resaltan los péptidos encontrados al analizar la muestra His-PhoQ(+) “nativa” (subrayados) y “modificada” (negrita). La cobertura de secuencia lograda fue del 50,3% y 47% respectivamente.

Debido a que no se logró cubrir el 100% de la secuencia con los péptidos identificados por MS, no pudimos poner a prueba la hipótesis previamente planteada, no siendo posible identificar péptidos que se encontraran diferencialmente presentes en una de las especies de His-PhoQ pero no en la otra. La razón por la que algunos péptidos son identificados en algunas muestras y no en otras es la naturaleza estocástica de la selección de iones. Esto quiere decir que en algunas muestras el péptido será seleccionado e identificado mientras que en otras corridas no lo será. Es cierto que la ausencia de un péptido puede ser causada por la modificación de ese péptido en la muestra, pero debe tenerse cuidado ya que esto puede ser debido al comportamiento aleatorio de la selección de iones. Entonces, este comportamiento impide identificar la presencia de péptidos modificados por simple comparación diferencial de los espectros de ambas muestras cuando la cobertura lograda no es mayor al 95-99%, por ejemplo entre los espectros de His-PhoQ(+) “nativa” y “modificada”. En cuanto a los péptidos que nunca son identificados, generalmente son aquellos que son muy pequeños (menos de 6 aminoácidos) o muy grandes (más de 25 aminoácidos). También son raramente identificados aquellos péptidos que carecen de un residuo C-terminal básico (lo que puede ocurrir si el péptido deriva del extremo C-terminal de la proteína), dado que típicamente poseen una sola carga.

A pesar de no lograr la cobertura de toda la secuencia de la proteína PhoQ, fue posible monitorear el péptido conteniendo la cisteína 395 (Cys-395) a lo largo de todas las muestras. La cisteína (Cys) es un residuo interesante dado que es muy reactivo y puede existir en múltiples formas en los sistemas biológicos. Estas isoformas incluyen formación de puentes disulfuro, tiosulfinato y tiosulfonato; oxidación a ácidos sulfénico, sulfínico, sulfónico y tiosulfónico; transformación a dehidroalanina (DHA) y serina; palmitoilación y farnesilación; formación de aductos químicos con glutatión, 4-hidroxinonenal, 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina-J2, acrilamida y otros químicos varios (328). Entonces, para simplificar la diversidad de isoformas de Cys en los estudios de proteómica, típicamente se reducen y alquilan los residuos de Cys, lo que remueve los puentes disulfuro y las modificaciones reducibles (329).

A partir del análisis del péptido YCLEFVEISAR, conteniendo la Cys-395, se pudo observar que múltiples isoformas de este aminoácido estaban presentes en las muestras (cisteína oxidada a ácido cisteico, y cisteína modificada con propionamida o β -mercaptoetanol), pero desafortunadamente no se pudo confirmar la presencia de modificaciones lipídicas en este péptido. Más aún, cuando las muestras son reducidas y alquiladas con iodoacetamida, se observa que las modificaciones reducibles desaparecen (el ácido cisteico, y la modificación con propionamida o β -mercaptoetanol), confirmando la identidad de esas isoformas. Como se mencionó, una de las isoformas identificadas contiene propionamida, pero este es un aducto común en la obtención de muestras a partir de PAGE-SDS, resultante de la reacción de las cisteínas presentes en la proteína con la acrilamida libre. Entonces, este análisis sugiere que la Cys-395 es reactiva y modificada durante la corrida electroforética, lo que indicaría que la misma no está lipidada ya que esta lipidación prevendría la formación de estas modificaciones. En cuanto al análisis de la otra cisteína presente en la estructura de PhoQ, Cys-392, sólo fue posible identificar un péptido que la contiene al realizar la corrida de la muestra PhoQ(+) “nativa” reducida y alquilada con iodoacetamida. En este caso, dado que el tratamiento provoca la desaparición de modificaciones reducibles, tampoco fue posible determinar la presencia de modificaciones.

Mas allá del análisis detallado sobre el péptido conteniendo Cys-395, todos los archivos de datos fueron utilizados para buscar modificaciones lipídicas, tanto en cisteínas como lisinas, utilizando el algoritmo Andromeda (330), sin encontrarse modificación por miristoilación, palmitoilación, palmitoleilación, prenilación o geranil-geranilación en los péptidos identificados. Finalmente, a pesar de desconocer la naturaleza de la modificación los datos muestran que la banda adicional observada es la proteína PhoQ, y que corresponde a una versión completa de PhoQ con una masa incrementada, sugiriendo una modificación post-traducciona.

1. c. Análisis por espectrometría de masas realizado en Uruguay

Dado que a partir de los resultados del experimento de LC-MS realizado en Canadá no se pudo extraer información concluyente respecto a la naturaleza de la banda adicional de la proteína PhoQ observada al crecer las células en presencia de ácido linoleico, se decidió repetir los ensayos utilizando equipos pertenecientes al Instituto Pasteur de Montevideo, tarea llevada a cabo en colaboración con el Dr. Germán Rosano.

En este caso, las bandas escindidas del gel de poliacrilamida fueron desteñidas y también digeridas con tripsina. Luego, los péptidos fueron recuperados con solventes orgánicos, concentrados por centrifugación al vacío y purificados por resinas de fase reversa C18. Los péptidos se analizaron por espectrometría de masa utilizando dos equipos: en primer lugar se utilizó un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems), y en segundo lugar las muestras volvieron a ser analizadas mediante un equipo ESI-LTQ Velos (Thermo Scientific), en ambos casos para obtener los espectros de MS. Las señales de mayor intensidad resultantes de este primer análisis fueron fragmentadas por CID (*collision-induced dissociation*) para obtener la secuencia de aminoácidos del péptido seleccionado (espectros de MS/MS). Los espectros resultantes se estudiaron con los programas mMass (www.mmass.org) y PatternLab (<http://pcarvalho.com/patternlab/>). Las proteínas fueron identificadas buscando en la base de datos NCBI nr usando el motor de búsqueda Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

Como se mencionó, primero se realizó el análisis de las muestras His-PhoQ(+) “nativa” y “modificada” utilizando un equipo MALDI TOF/TOF. Las

corridas en este equipo permitieron, nuevamente, identificar que las bandas escindidas del gel de poliacrilamida corresponden mayoritariamente a la proteína PhoQ, aunque también se detectó presencia de queratina como contaminante. Si bien se tomaron todos los recaudos necesarios durante la manipulación y procesamiento, es posible que restos de piel hayan caído sobre la muestra durante el proceso de corte de las bandas a partir del gel de poliacrilamida. Por otra parte, estos análisis arrojaron una cobertura de secuencia para las formas “nativa” y “modificada” de PhoQ de 42% y 45% (Figura R&D.III.9), respectivamente, valores similares a los obtenidos en el análisis realizado por el Dr. Nichollas Scott.

MNKFAR**HFLP** **LSLR**VREFLA TAGVVLVLSL AYGIIVALVGY SVSFDKTTFR **LLRGESNLFY** **TLAKWENNKI**
 SVELPENLDM QSPTMTLIYD ETGK**LLWTOR** **NIPWLIKSIQ** PEWLKTNGFH EIETNVDATS TLLSEDHSAQ
 EKLKEVRE**EDD** **DDAEMTHSVA** **VNIYPATARM** **PQLTIVVVDI** **IPIELKRSYM** VWSWFVYVLA ANLLLVIPLL
 WIAAWWSLRP IEALAREVRE **LEDHHREMLN** **PETTRELTSL** VRNLNQLLKS ERERYNKYRT TLTDLTHSLK
TPLAVLQSTL **RSLRNEKMSV** **SKAEPVMLEQ** **ISRISQOIGY** **YLHRASMRGS** GVLRSR**ELHP** **VAPLLDNLIS**
ALNKVYQRKG VNISMDISPE ISFVGEQNDP VEVMGVLDN ACK**YCLEFVE** **ISARQTDHHL** **HIFVEDDGGP**
IPHSKRSLVF DRGQR**ADTLR** **PGQGVGLAVA** **REITEQYAGO** **IIASDILLGG** **ARMEVVFGRQ** HPTQKEE

FIGURA R&D.III.9: Cobertura de secuencia de PhoQ por péptidos identificados mediante MALDI TOF/TOF en Uruguay. Se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína PhoQ. Se resaltan los péptidos encontrados al analizar la muestra His-PhoQ(+) “nativa” (subrayados) y “modificada” (negrita). La cobertura de secuencia lograda fue del 42% y 45% respectivamente.

En este primer análisis se pudo establecer, utilizando la herramienta “Peak compare” del servidor *mMass*, que los picos obtenidos en el espectro de la muestra PhoQ “nativa” se encuentran también en el espectro de la muestra “modificada”. Sin embargo, en esta última se evidenció la presencia de picos que no se encontraban en la forma no modificada de PhoQ, pero por su baja intensidad de señal no se logró obtener información respecto a la secuencia (y no es posible asegurar se trate de un fragmento de proteína). Más aún, las masas medidas de los péptidos que lograron ser identificados fueron iguales a las teóricas, indicando que los péptidos encontrados no presentan modificaciones post-traduccionales. Al igual que en los resultados obtenidos de las muestras analizadas en Canadá, se detectó la modificación de Cys-395 por propionamida, resultado de la reacción con acrilamida libre como se explicó oportunamente. En este caso, tampoco fue posible identificar un péptido conteniendo la cisteína 392, por lo que no podemos extraer conclusiones respecto a la presencia o no de modificaciones en este aminoácido (Figura R&D.III.9). Finalmente,

no se encontraron modificaciones del tipo palmitoil o miristoil, en cisteínas y triptófanos, ni del tipo acetyl-lisina en ninguno de los péptidos identificados.

Aprovechando la disponibilidad de un equipo de mayor resolución y sensibilidad, el Dr. Rosano repitió el análisis anterior pero introduciendo las muestras en un equipo ESI-LTQ Velos (Thermo Scientific). En esta oportunidad, fue posible incrementar la cobertura de la secuencia de His-PhoQ(+) “modificada” hasta un 47%, pero tampoco se identificaron modificaciones post-traduccionales en los péptidos analizados. Más aún, utilizando este equipo no fue posible detectar péptidos conteniendo las cisteínas 392 y 395, por lo que no pudo extraerse información respecto a estos residuos (Figura R&D.III.10).

MNKFARHFLP LSLRVRELLA TAGVVLVLSL AYGIVALVGY SVSFDKTTFR **LLRGESNLFY TLAKWENNKI**
SVELPENLDM QSPTMTLIYD ETGKLLWTOR NIPWLIKSIQ PEWLKTNGFH EIETNVDATS TLLSEDHSAQ
EKLKEVREDD DDAEMTHSVA VNIYPATARM PQLTIVVVDI IPIELKRSYM VWSWFVYVLA ANLLLVIPLL
WIAAWWSLRP IEALAREVRE **LEDHHREMLN PETTRELTSL VRNLNQLLKS ERERYNKYRT TLTDLTHSLK**
TPLAVLQSTL RSLRNEKMSV SKAEPVMLEQ ISRISQOIGY YLHRASMRGS GVLLSRELHP VAPLLDNLIS
ALNKVYQRKG VNISMDSPE ISFVGEQNDP VEVMGNVLDN ACKYCLEFVE ISARQTDHHL HIFVEDDGPG
IPHSKRSLVF DRGQRADTLR PGQGVGLAVA REITEQYAGO IIASDSLGG ARMEVVFGRQ HPTQKEE

FIGURA R&D.III.10: Cobertura de secuencia de PhoQ por péptidos identificados mediante ESI-LTQ en Uruguay. Se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína PhoQ. Se resaltan los péptidos encontrados al analizar la muestra His-PhoQ(+) “nativa” (subrayados) y “modificada” (negrita). La cobertura de secuencia lograda fue del 69% y 47% respectivamente.

Podemos concluir que, dado que en los análisis de MS no se identificaron proteínas de bajo peso molecular, se descartaría la hipótesis de que la interacción de PhoQ con otra(s) proteína(s) sea la causa de la diferencia de movilidad electroforética observada. Además, el agregado de agentes reductores, como β -mercaptoetanol 5% o DTT 25 mM (adicionalmente al porcentaje de β -mercaptoetanol que contiene el buffer de muestra), a las muestras previamente a la corrida no provocó la desaparición de la banda adicional que reacciona con los anticuerpos anti-PhoQ (no mostrado), favoreciendo la hipótesis de que se trata de una modificación post-traducciona sobre la proteína sensora.

Por último, los resultados de los análisis por espectrometría de masas realizados tanto en Canadá como en Uruguay nos permitieron cubrir, en conjunto, el 60% de la secuencia de la proteína His-PhoQ “modificada” (Figura R&D.III.11), no

detectándose diferencias de masa entre la predicha y la observada en los péptidos identificados, excluyendo la posible presencia de modificaciones en estas secuencias.

MNKFAR**HFLP** **LSLR**VRFLLA TAGVVLVLSL AYGIVALVGY SVSFDKTTFR **LLRGESNLFY** **TLAKWENNKI**
SVELPENLDM **QSPTMTLIYD** **ETGKLLWTPQ** **NIPWLIKSIQ** **PEWLK**TNGFH EIETNVDATS TLLSEHSAQ
EKLK**EVREDD** **DDAEMTHSVA** **VNIYPATARM** **PQITIVVVDI** **IPIELK**RSYM VWSWFVYVLA ANLLVIPLL
WIAAWWSLRP IEALAREVRE **LEDHHREMLN** **PETTRELTSL** **VRNLNQLLKS** **ERERYNKYRT** **TLTDLTHSLK**
TPLAVLQSTL **RSLRNEKMSV** **SKAEPVMLEQ** **ISRISQOIGY** **YLHRASMRGS** **GVLLSRELHP** **VAPLLDNLIS**
ALNKVYQRKG VNISMDSPE ISFVGEQNDF VEVMGNVLDN ACK**YCLEFVE** **ISARQTDHHL** **HIFVEDDGGP**
IPHSKRSLVF DRGOR**ADTLR** **PGQGVGLAVA** **REITEQYAGO** **IIASDSLGG** **ARMEVVFGRQ** HPTQKEE

FIGURA R&D.III.11: Cobertura de secuencia de PhoQ por péptidos identificados mediante MS en Canadá y Uruguay. Se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína PhoQ. Se resaltan los péptidos encontrados al analizar la muestra His-PhoQ(+) "nativa" (subrayados) y "modificada" (negrita). La cobertura de secuencia lograda fue del 72% y 60% respectivamente.

Hay que destacar el análisis realizado sobre la cisteína 395, que mostró que la misma se encuentra modificada por propionamida, un aducto de la reacción con acrilamida libre durante la corrida electroforética, lo que nos permite concluir que la misma no se encuentra modificada previamente a la separación de las muestras por PAGE-SDS, porque la presencia de un sustituyente en este residuo prevendría la reacción con acrilamida libre. Finalmente cabe mencionar, además, que en ninguna de las corridas fue posible detectar péptidos que presenten en su secuencia la cisteína 392, por lo que resulta interesante plantear futuros experimentos (p.e. mediante la utilización de mutantes) tendientes a dilucidar si este residuo presenta modificaciones que sean las responsables de la movilidad electroforética alterada que observamos para la proteína PhoQ, cuando se analizan fracciones de membrana interna obtenidas a partir de células crecidas en presencia de ácido linoleico.

R&D. III. 2. Estudio realizado con variantes quiméricas o truncadas de la proteína sensora PhoQ

Debido a que no fue posible identificar la modificación post-traducciona sobre la proteína PhoQ o detectar péptidos que posean masa diferencial entre las versiones de His-PhoQ "nativa" y "modificada" en los ensayos de MS, se continuó el estudio del efecto observado trabajando con proteínas quiméricas de PhoQ y EnvZ o con variantes de PhoQ, a modo de establecer una región más acotada donde podría estar ocurriendo la PTMs. En la figura R&D.III.12 se presentan en forma esquemática

las variantes quiméricas y truncadas de la proteína PhoQ que serán analizadas en esta sección.

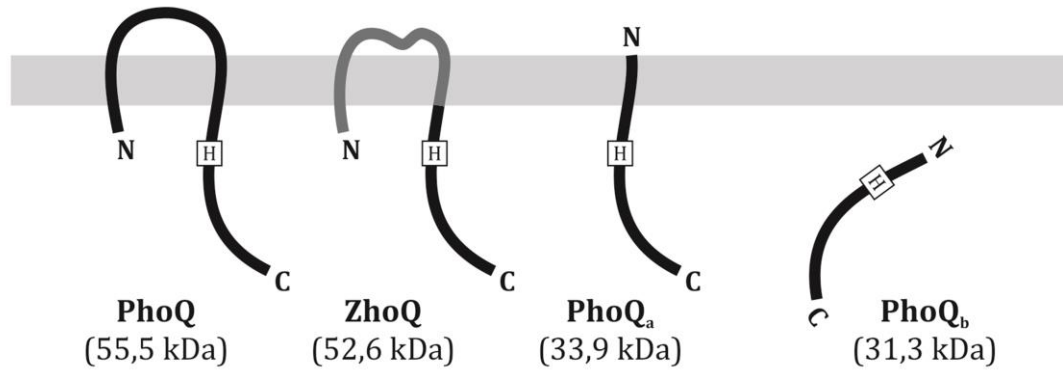


FIGURA R&D.III.12: Variantes quiméricas y truncadas de la proteína sensora PhoQ de *Salmonella enterica*. Se muestran de manera esquemática las estructuras de la proteína PhoQ, de la proteína quimérica ZhoQ (185 aminoácidos EnvZ + 267 aminoácidos PhoQ), y de las versiones truncadas PhoQ_a y PhoQ_b. Además, se detalla la ubicación de la histidina 277 (H), residuo aceptor del fosfato en la reacción de autofosforilación, y los pesos moleculares predichos de cada una de las variantes.

Para ello se utilizó una cepa de *Escherichia coli* que expresa la proteína quimérica ZhoQ, constituida por los 185 aminoácidos del extremo N-terminal de EnvZ y los 267 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína PhoQ, con un peso molecular predicho de 52,6 kDa. Dado que no se observó presencia de bandas adicionales al ensayar preparaciones de membranas internas de células sobreexpresando EnvZ crecidas en presencia de ácido linoleico, los ensayos utilizando esta proteína quimérica nos permitiran establecer *a priori* si la PTMs ocurre en la porción N-terminal o C-terminal de la proteína PhoQ. En cuanto a la porción C-terminal de esta proteína quimérica, comprende toda la porción citoplásmica de PhoQ luego del TM2, excluyendo de esta manera los dos dominios transmembranas y el dominio sensor de PhoQ.

El protocolo llevado a cabo consiste en crecer las células de *E. coli* M15 pREP4 conteniendo el plásmido pQE31::*phoQ* o pQE31::*ZhoQ* hasta $DO_{600nm} = 0,5-0,6$ en medio de cultivo LB en presencia de ácido linoleico a concentración final $0,5 \text{ mg/ml}$ o en medio control. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realiza por agregado de IPTG a concentración final $0,7 \text{ mM}$, y posterior incubación durante 3 horas a 37°C en agitación. Finalmente, se realiza la preparación de membrana interna por técnicas de fraccionamiento celular, como se describe en la

sección M&M.13.b. Una vez obtenidas las fracciones de membranas enriquecidas en la proteína PhoQ o en la quimera ZhoQ, el control de la expresión se realizó mediante ensayo de Western-blot con anticuerpos anti-PhoQ_{cit}, resultado que se muestra en la figura R&D.III.13.

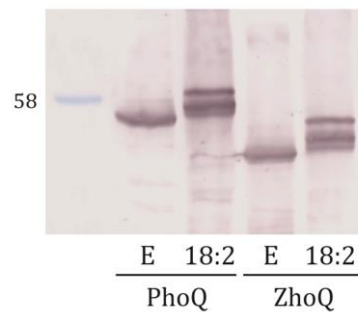


FIGURA R&D.III.13: La proteína quimérica ZhoQ también presenta especies adicionales que reaccionan con anticuerpos anti-PhoQ. Las células de *E. coli* sobreexpresando PhoQ o ZhoQ fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de ácido linoleico (18:2) o la cantidad equivalente de etanol (E). Las muestras provenientes de membranas internas conteniendo PhoQ o ZhoQ fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida) y transferidas a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-PhoQ_{cit}. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa).

El análisis del resultado confirma la presencia de las dos bandas que reaccionan con los anticuerpos anti-PhoQ cuando se sobreexpresa la proteína PhoQ completa en medio de cultivo con adición de C18:2. Por otra parte, el resultado mostrado en la figura R&D.III.13 también nos permite establecer que la proteína quimérica ZhoQ se presenta como dos especies que reaccionan con anticuerpos anti-PhoQ_{cit} cuando las células que la expresan son crecidas en presencia de ácido linoleico (ZhoQ(+)) “nativa” y “modificada”), contrario a lo ocurrido cuando el vehiculizante de los mismos está presente en el medio de crecimiento donde se aprecia solo una especie de ZhoQ. Si bien no podemos descartar que la PTMs se encuentre en la porción correspondiente a EnvZ, dada la baja identidad de secuencia entre las porciones N-terminal de PhoQ y EnvZ (17,7%) este resultado contribuye a sugerir que la PTM que está afectando la movilidad electroforética se localizaría en el extremo C-terminal de la proteína sensora PhoQ.

Cabe señalar que en este ensayo se apreció que las bandas correspondientes a PhoQ(+)) “nativa” y ZhoQ(+)) “nativa” también migran a un peso molecular ligeramente mayor que la de las respectivas proteínas obtenida a partir de células

crecidas en medio control, lo que podría indicar que existen distintos grados de modificación sobre la estructura de PhoQ.

Hasta el momento de la escritura de este trabajo de tesis no fue posible realizar estos experimentos con la otra versión quimérica contraparte de PhoQ y EnvZ, es decir, la formada por la porción N-terminal de PhoQ y el extremo C-terminal de EnvZ. Esta quimera, que denominaremos QZ, comprende los dos segmentos transmembrana y la región sensora de PhoQ (220 aminoácidos), fusionados a la porción citoplásmica de EnvZ (265 aminoácidos). Para este caso, deberá realizarse la inmunodetección con anticuerpos anti-PhoQ_{per} (dirigidos contra la porción periplásmica o sensora de PhoQ) y/o con anticuerpos anti-EnvZ_{cit} (que reconocen la porción citoplásmica de EnvZ).

En base a este resultado, se continuó con los análisis tendientes a determinar aquella(s) región(es) de la proteína que eran modificadas post-traduccionamente, para lo cual se utilizaron versiones truncadas de PhoQ que corresponden a la porción C-terminal de la proteína. Más específicamente, la versión truncada PhoQ_a comprende el segundo segmento transmembrana (TM2) y la porción citoplásmica de la proteína sensora (298 aminoácidos, 34 kDa), y en experimentos previos del laboratorio (no publicados) se determinó que se expresa anclada a la membrana interna; mientras que, aquella que denominaremos PhoQ_b, esta formada por sólo 6 aminoácidos del segmento TM2 y la porción citoplásmica completa (276 aminoácidos, 31,3 kDa), y es expresada de manera soluble en el citoplasma celular (figura R&D.III.12).

Nuevamente, las células sobreexpresando estas variantes de PhoQ fueron crecidas en medio de cultivo LB con agregado de C18:2 a concentración final 0,5 mg/ml o en medio control, y la inducción de la expresión proteica fue realizada mediante agregado de IPTG 0,7 mM final e incubación a 37°C en agitación durante 3 hs. Una vez realizado el fraccionamiento celular, de acuerdo a lo descrito en la sección M&M.13.b, las muestras fueron separadas por PAGE-SDS, electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas con anticuerpos anti-PhoQ_{cit}. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R&D.III.14.

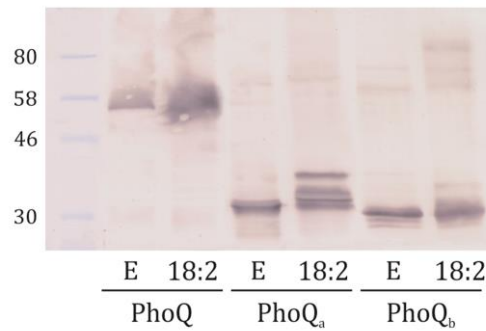


FIGURA R&D.III.14: Las proteínas truncadas *PhoQ_a* y *PhoQ_b* también presenta especies adicionales que reaccionan con anticuerpos anti-*PhoQ*. Las células de *S. Typhimurium* sobreexpresando *PhoQ*, *PhoQ_a* o *PhoQ_b* fueron crecidas en medio de cultivo LB con adición de 0,5 mg/ml de ácido linoleico (18:2) o la cantidad equivalente de etanol (E). Las muestras provenientes de membranas internas conteniendo las proteínas respectivas fueron analizadas por PAGE-SDS (12% poliacrilamida). Los geles fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-*PhoQ_{cit}*. Se indican los pesos moleculares correspondientes (en kDa).

Al analizar los resultados obtenidos al separar las muestras en PAGE-SDS e inmunodetectarlas con anticuerpos anti-*PhoQ* (figura R&D.III.14), podemos observar que la proteína *PhoQ_a* también presenta un patrón de expresión diferente entre las muestras obtenidas a partir de células crecidas en medio control o en medio con agregado de C18:2 (*PhoQ_a*(-) y *PhoQ_a*(+), respectivamente). En este último caso, los anticuerpos dirigidos contra la porción citoplásmica de *PhoQ* permitieron detectar al menos tres bandas que muestran una migración electroforética diferente a aquella observada para la proteína *PhoQ* proveniente de células crecidas en medio control. De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento es posible apreciar, si se realiza un análisis más exhaustivo, que la proteína *PhoQ* completa también se presenta como 3 bandas (como por ejemplo en las figuras R&D.III.2, 6 y 13), siempre en el caso de muestras provenientes de células crecidas en presencia de C18:2. Por otra parte, para el caso de la versión *PhoQ_b* no se observa un patrón de expresión diferencial entre muestras obtenidas desde células crecidas en medio de cultivo control o con adición de C18:2. Dado que la proteína *PhoQ_a* se expresa anclada a la membrana interna bacteriana mientras que la variante *PhoQ_b* es obtenida de manera soluble, este resultado nos permitiría especular que el anclaje de *PhoQ* a la membrana interna es requerido para permitir su modificación post-traducciona, ya sea porque la modificación tiene relación con el anclaje de la proteína a la membrana, debido a que la modificación es estable en el contexto de la bicapa lipídica, o porque las enzimas responsables de producir la modificación se hallan en la membrana bacteriana o en contacto con la misma.

R&D. III. 3. Conclusiones finales

En el primer capítulo de este trabajo de tesis se presentaron los resultados que llevaron a la identificación de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (LCUFAs) como inhibidores específicos de la expresión de genes regulados por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*, y a establecer que la represión en la actividad de este sistema era debida a que los LCUFAs actuaban inhibiendo la actividad autoquinasa de la proteína sensora anclada en membrana interna PhoQ. Paralelamente a los ensayos de actividad de autofosforilación de la proteína PhoQ se realizaron experimentos de Western-blot para verificar que no existiera una expresión o degradación diferencial de PhoQ en presencia de estos LCUFAs, y poder asegurar que la inhibición es específicamente sobre la actividad catalítica de la proteína sensora. Esto llevó a observar que, en las muestras provenientes de células crecidas en medio de cultivo LB con agregado de ácido linoleico (C18:2) se detectaba la aparición de bandas adicionales que reaccionaban con los anticuerpos dirigidos contra la porción citoplásmica de PhoQ. Esto nos planteó la incógnita de si existían otras proteínas que podrían estar interaccionando con PhoQ o si una modificación post-traducciona (PTMs) de esta proteína podrían ser los responsables de esta movilidad electroforética alterada.

Se determinó la presencia de otras proteínas o de PTMs mediante estudios de espectrometría de masa (MS). Para ello, se logró purificar la proteína recombinante His-PhoQ, tanto a partir de células crecidas en medio de cultivo LB con etanol (-) como con C18:2 (+), comprobándose en esta última la presencia de las dos bandas que reaccionan tanto con anticuerpos anti-PhoQ como anti-His, especies que denominamos “nativa” y “modificada”. Estas dos especies pudieron también ser detectadas al teñir geles de poliacrilamida, y luego escindidas las bandas respectivas y enviadas para su análisis por MS. En todas las corridas realizadas pudo verificarse que los péptidos detectados pertenecían a la proteína PhoQ, y tomando en conjunto todos los ensayos de MS se logró cubrir un 72% de la secuencia de PhoQ “nativa” y un 60% de la versión “modificada” de esta proteína. Desafortunadamente, no se pudieron detectar diferencias entre la masa de los péptidos analizados y la masa predicha para los mismos, indicando que en la secuencia de PhoQ(+) “modificada” cubierta no existen PTMs a las cuales podamos atribuir la diferencia de movilidad electroforética observada en los ensayos de PAGE-SDS y Western-blot. Debido a que

en los estudios de MS no se detectaron péptidos correspondientes a proteínas cuyo peso molecular sea similar al calculado para la diferencia de migración electroforética entre las versiones “nativa” y “modificada” de PhoQ (aproximadamente 4,7 kDa), y también debido a que en los ensayos de PAGE-SDS en condiciones desnaturalizantes mas drásticas, como el agregado de urea (resultados no mostrados), no se alteraron los patrones de migración, se descartó la hipótesis de que otras proteínas pudieran estar interaccionando con la proteína sensora PhoQ.

Posteriormente, continuando el estudio de este efecto con proteínas quiméricas entre los sensores PhoQ y EnvZ, pudimos acotar la región donde se encontraría la PTMs al extremo C-terminal de la proteína PhoQ, más específicamente a la región citoplásmica ubicada luego del segmento transmembrana 2. Como se mencionó previamente, esta región contiene dos cisteínas, residuos 392 y 395, que se ha demostrado son altamente reactivos y capaces de albergar modificaciones post-traduccionales. El segundo de ellos, Cys-395, se encontró en los péptidos detectados por MS modificado por propionamida, un aducto producto de la reacción con acrilamida libre presente durante la separación por PAGE-SDS, indicando que el mismo no se encontraría modificado en las muestras previamente a la corrida electroforética. Por otra parte, el residuo de cisteína 392 no ha podido ser detectado en ninguna de las corridas en los espectrómetros de masa utilizados, lo que nos impide poder sacar conclusiones respecto a esta cisteína. Esto puede ser atribuido a que, según los sitios de corte por tripsina predichos mediante el servidor bioinformático PeptideCutter (ExpASY), el péptido que la contiene poseería 44 aminoácidos, lo cual constituye un fragmento muy grande para ser detectado por los equipos de MS. Esto podría ser salvado en un futuro utilizando otra(s) enzima(s) para realizar la digestión de la proteína previamente a la introducción para su análisis por MS, o mediante la creación de proteínas mutantes (por ejemplo reemplazando la cisteína 392 por serina) y luego analizando el perfil de bandas detectadas con anticuerpos anti-PhoQ_{cit} en muestras obtenidas a partir de células crecidas en presencia de C18:2.

Por último, si tomamos en conjunto los resultados provenientes del análisis utilizando la proteína quimérica ZhoQ, indicando que la modificación se localiza en el extremo C-terminal de PhoQ, y la zona cubierta en este extremo por los péptidos detectados por MS para la proteína PhoQ(+) “modificada”, podemos reducir aún más

la región que contendría la modificación post-traducciona a los péptidos IEALAREVR, NLNQLLKSERERYNKYR, SLRNEK, VYQRKGVNISM DISPEISFVGEQND FVEVMGNVLDNACK, RSLVFDRGQR y QHPTQKEE.

Dado que la aparición de bandas adicionales de PhoQ ocurre sólo para células crecidas en presencia de C18:2 y no de otros LCUFAs, se podría especular que esta modificación no necesariamente posee relación con el mecanismo inhibitorio por parte de los ácidos grasos insaturados sobre la actividad autoquinasa de PhoQ. Sin embargo, no podemos descartar completamente esta hipótesis con los resultados con los que contamos hasta el momento, debido a que el ácido linoleico ha mostrado siempre un mayor efecto en la represión de la actividad transcripcional de genes regulados por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, por lo que es posible que para el resto de los LCUFAs este efecto de aparición de especies adicionales que reaccionen contra anticuerpos anti-PhoQ se produzca a mayores concentraciones. Alternativamente, es posible que C18:2 específicamente active o reprima vías que lleven a la modificación de PhoQ, y que este mecanismo no este relacionado con la inhibición del sistema por parte de LCUFAs. En este sentido, en una búsqueda en los datos obtenidos a partir de los ensayos de microarreglos, no se detectaron genes involucrados en procesos que lleven a la introducción de PTMs en proteínas cuya expresión se encontrara incrementada o disminuida cuando las células son crecidas en presencia de C18:2. Más aún, tampoco podemos hipotetizar que C18:2 sea la molécula que se encuentra anclada a PhoQ, modificándola, dado que el efecto es también observado en una mutante en el gen que codifica para FadD, la enzima responsable de traslocar los ácidos grasos al interior celular y activarlos con coenzima A, lo cual prevendría la interacción entre C18:2 y la porción citoplásmica de PhoQ donde proponemos esta ocurriendo esta modificación. Además, ensayos preliminares creciendo las células de *Salmonella Typhimurium* en presencia de una mezcla isotópica de C18:2 frío y [1-¹⁴C]ácido linoleico marcado radioactivamente, y repitiendo los experimentos de Western-blot luego del fraccionamiento celular para obtener membranas internas enriquecidas en la proteína PhoQ, no mostraron incorporación de marca radioactiva a las banda correspondiente a la proteína sensora en sus estados “nativo” o “modificado”, aportando más evidencias que descartarían aquella posibilidad.

Finalmente, la identificación del tipo de modificación nos permitirá ahondar en los mecanismos, tanto genéticos como celulares, que llevan a la aparición de especies adicionales de PhoQ y a los motivos por los cuales esta modificación sólo es observada cuando las células son crecidas en presencia de C18:2 y no de otros LCUFAs de similares características fisicoquímicas. En última instancia, será necesario analizar si esta modificación ocurre en condiciones con las cuales *Salmonella* se encuentra durante su vida ambiental libre o dentro del hospedador. El conocimiento más detallado de todos estos procesos nos permitirá determinar cual es la relevancia de la modificación post-traducciona l de PhoQ en la fisiología y/o la virulencia de esta bacteria patógena.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

R&C. 1. Resumen

El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ regula numerosos fenotipos de virulencia en *Salmonella enterica*. La proteína sensora PhoQ alterna entre un estado quinasa y fosfatasa en respuesta a la disponibilidad de Mg^{2+} en el medio, lo cual define el nivel de fosforilación del regulador de respuesta PhoP, modulando su actividad transcripcional. Este sistema constituye un objetivo estratégico para la búsqueda y desarrollo de compuestos que modulen específicamente su acción, destinados a la prevención y tratamiento de las patologías a las que *Salmonella* da origen.

En este sentido, durante el trabajo de tesis de la Dra. Mariela Sciara se identificó que un extracto metanólico de *Lamium amplexicaule* era capaz de inhibir específicamente la expresión de genes regulados por el TCS PhoP/PhoQ, y se determinó que las especies responsables de este efecto eran los ácidos grasos insaturados de cadena larga presentes en la muestra. Mediante el uso de AG libres puros de origen comercial, se verificó que LCUFAs reprimían de manera dosis dependiente la expresión de genes regulados por PhoP, pero no afectaban la expresión de genes regulados por otros sistemas de dos componentes en el rango de concentraciones ensayadas. Además, los ácidos grasos saturados no mostraron efecto sobre ninguno de los genes reporteros, indicando especificidad de sustrato y de blanco de acción por parte de los LCUFAs sobre el sistema PhoP/PhoQ.

Durante el presente trabajo de tesis, se estableció que, al ser agregados exógenamente al medio de cultivo bacteriano, los LCUFAs inhiben específicamente la capacidad de autofosforilación de la proteína sensora PhoQ en el mecanismo de transducción de la señal, lo que lleva a una disminución en los niveles de PhoP fosforilado y, finalmente, a una represión en la expresión de los genes del regulón *phoPQ*.

Los ácidos grasos son metabolizados por la vía de β -oxidación, pero la integridad de esta ruta metabólica no es necesaria para observar la represión sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, permitiendo concluir que los LCUFAs son las especies responsables de este efecto, y no los productos intermedios o el producto final de esta vía.

Por otra parte, también se observó que la expresión de genes regulados por PhoP cuando el ácido graso insaturado era removido del medio de cultivo eran

equiparables a los niveles de expresión en ausencia de compuesto, lo que lleva a concluir que el efecto de LCUFAs sobre el TCS es de naturaleza reversible.

Además, se determinó que la presencia en simultáneo de dos ácidos grasos insaturados en el medio de crecimiento ejerce un efecto represor que es mayor que el de cada uno cuando se encuentra presente de manera individual. Por último, se ensayaron muestras de bilis fresca de rata que fueron agregadas al medio de cultivo LB, y que también mostraron inhibir de manera específica y dosis-dependiente la expresión del gen reportero regulado por PhoP sin afectar la actividad transcripcional del gen reportero control. Esto nos permite especular que existen compuestos en este fluido que podrían constituir señales fisiológicas para que *Salmonella* pueda coordinar la expresión de fenotipos de virulencia a través de la regulación de la actividad del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Dado que no fue posible realizar un análisis más detallado de los componentes presentes en la muestra de bilis fresca, no podemos asegurar que el efecto inhibitorio sea debido a LCUFAs, cationes divalentes o una combinatoria de ambos presente en la muestra, o a otros compuestos que no han sido determinados hasta el momento.

Estos resultados permiten concluir que los LCUFAs, sin mediar procesos metabólicos en la célula, actuarían como señales que inhiben la actividad de autofosforilación de la proteína sensora PhoQ, ya sea como ligandos interactuando directamente con la misma, o a través de la modificación de propiedades de la membrana interna bacteriana en la cual se encuentra inserta y que afecten la actividad catalítica de la misma.

El hecho de que los ácidos grasos insaturados puedan ser señales que permitan a *Salmonella* distinguir los diferentes ambientes en los que se encuentra, y de esta manera, en conjunto con otros estímulos, coordinar los procesos para una exitosa invasión del hospedador, nos llevó a estudiar el patrón de expresión génica de cepas de *Salmonella* Typhimurium crecidas en presencia de C18:2 mediante ensayos de microarreglos. A partir del análisis del conjunto de datos, pudimos identificar varios genes involucrados en un mismo proceso metabólico o celular cuya expresión se encontraba reprimida en presencia de C18:2 en el medio de cultivo de una manera dependiente de PhoP. Tomando algunos de ellos, se realizó un análisis bioinformático que llevó a la identificación de cajas putativas de unión a PhoP sobre genes

involucrados en el metabolismo de arginina, glutamato y aspartato, en el metabolismo de poliaminas, y en el mecanismo de sensado de la densidad poblacional (*quorum-sensing*). Al momento de escritura de este trabajo de tesis, se comenzó con la caracterización del efecto de la mutación en el regulador de respuesta PhoP sobre la actividad transcripcional y sobre los niveles de expresión proteica del gen *speB* (que codifica para una de las enzimas del metabolismo de espermidina) y del operon *lsr* (que codifica para el transportador responsable del *quorum-sensing* bacteriano).

Finalmente, se ha notado en ensayos de Western-blot que muestras de células de *S. Typhimurium* crecidas en presencia de C18:2 que han sido inmunodetectadas con anticuerpos anti-PhoQ presentan bandas adicionales (PhoQ(+) “modificada”) a las observadas en muestras provenientes de células crecidas en medio control (PhoQ(-)), y que las mismas migran a un peso molecular aparente mayor que el correspondiente a la especie “sin modificar” de PhoQ. Se logró expresar en forma heteróloga en *Escherichia coli*, solubilizar y purificar la proteína recombinante His-PhoQ, tanto a partir de células crecidas en medio de cultivo control como con agregado de C18:2. En esta última condición también se evidenció la presencia de bandas adicionales, a pesar de estar trabajando en otro entorno génico al momento de expresar la proteína. Las fracciones resultantes de la purificación tuvieron una resolución electroforética que permitió escindir las bandas de manera individual para su análisis por espectrometría de masa (MS).

Los estudios por MS arrojaron, en conjunto, una cobertura de secuencia de 72% y 60% para las proteínas His-PhoQ “nativa” y His-PhoQ “modificada”, pero no se pudieron identificar péptidos cuya masa detectada fuera diferente a la predicha y que pudiera deberse a la presencia de modificaciones post-traduccionales (PTMs). Tampoco se encontraron péptidos correspondientes a proteínas que posean un peso molecular similar al observado en el desplazamiento electroforético en la especie “modificada”. En base a estos y otros resultados, provenientes de tratamiento con agentes reductores, o de separación de las muestras en PAGE-SDS en presencia de urea 6M, favorecemos la hipótesis de que se trata de una PTMs que ocurre sobre la estructura del sensor PhoQ.

Por otro lado, mediante el análisis del perfil de inmunodetección de muestras de cepas expresando la proteína quimérica ZhoQ crecidas en C18:2, se logró acotar la

región en la proteína PhoQ donde se localizaría la modificación al extremo C-terminal citoplásmico de la misma. Más aún, por comparación entre versiones truncadas de PhoQ, observamos que el anclaje a la membrana de este dominio citoplásmico es condición necesaria para que la PTMs se produzca.

Por último, se ha comenzado la caracterización del efecto de nuevos compuestos obtenidos a partir de extractos naturales sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, pero los resultados son muy preliminares por lo que no han sido incluidos en este trabajo de tesis.

R&C. 2. Conclusiones generales

2. a. Conclusiones del Capítulo 1

- Se estableció que el blanco de acción de los LCUFAs en el mecanismo de transducción de señales del TCS PhoP/PhoQ es la actividad autoquinasa de la proteína sensora PhoQ.

- Esta inhibición sobre la HQ PhoQ ocurre en presencia de AG insaturados en el medio de crecimiento bacteriano, pero no hay represión cuando AG saturados de igual longitud de cadena carbonada se encuentra en el medio de cultivo.

- Ninguno de los ácidos grasos, saturados o insaturados, produjo inhibición de la actividad autoquinasa de la HQ homóloga EnvZ, por lo que se podría descartar un efecto sobre las HQ de Clase 1.

- La represión de la actividad de auto-fosforilación de PhoQ fue dependiente de la dosis de C18:2 agregada al medio de cultivo.

- El efecto sobre la actividad transcripcional de los genes PhoP-regulados y sobre la actividad autoquinasa de PhoQ es independiente de la presencia de una vía de β -oxidación intacta, por lo que la inhibición no es producto de metabolitos intermedios de esta vía o del acetyl-CoA producto final de la misma.

- El efecto represor sobre el TCS PhoP/PhoQ es revertido cuando los LCUFAs son removidos del medio de crecimiento.

- La presencia de una combinatoria de C18:1 y C18:2 en el medio de crecimiento produce un efecto mayor que el ejercido por cada uno de manera individual.

- Se evidenció inhibición de la expresión de genes regulados por PhoP cuando las bacterias son crecidas en medio de cultivo con agregado de bilis fresca de rata, pero no se identificaron las especies responsables de la misma y si el blanco de acción es el mismo que el descrito para los LCUFAs.

2. b. Conclusiones del Capítulo 2

- Se llevaron a cabo ensayo de microarreglos a partir de muestras de ARN obtenidas de cepas de *Salmonella* Typhimurium salvaje y *phoP* crecidas en medio de cultivo en ausencia y presencia de C18:2.

- El análisis de los datos llevó a la identificación de un conjunto de genes activados por PhoP y reprimidos por C18:2.

- Se identificaron cajas putativas de unión a PhoP en genes involucrados en el metabolismo de arginina, glutamato y aspartato, en el metabolismo de poliaminas, y en el mecanismo de *quorum-sensing*.

- Se observó regulación a nivel transcripcional en la expresión del operon involucrado en *quorum-sensing* por parte del regulador de respuesta PhoP.

- Los niveles de expresión proteica de SpeB se vieron disminuidos en ausencia de PhoP en fase estacionaria de crecimiento.

2. c. Conclusiones del Capítulo 3

- Se detectaron especies adicionales correspondientes a la proteína PhoQ cuando las cepas de *Salmonella* son crecidas en presencia de ácido linoleico.

- Se comprobó que la expresión heteróloga de His-PhoQ en células de *E. coli* crecidas en medio LB con agregado de C18:2 también muestra bandas adicionales correspondientes a la proteína sensora.

- Fue puesta a punto la solubilización y purificación de la proteína sensora mediante cromatografía de afinidad, lo que finalmente permitió la escisión de bandas individuales para su análisis por MS.

- Los estudios por MS no permitieron identificar proteínas cuya masa corresponda con la diferencia de tamaño observada entre las bandas que reaccionan con anticuerpos anti-PhoQ, ni péptidos con masa diferencial que correspondan a PTMs de la proteína PhoQ.

- Se logró monitorear la cisteína (Cys) 395 en las muestras, concluyéndose que la misma no se encuentra modificada previamente a la corrida electroforética. No se pudo realizar el mismo análisis sobre la Cys-392, ya que en ninguna de las muestras se detectaron péptidos que la contengan.

- Estudios con variantes quimeras entre PhoQ y EnvZ o con versiones truncas de la proteína PhoQ, permiten sugerir que la PTMs ocurriría en el extremo C-terminal citoplásmico, y que es necesario el anclaje de la proteína a la membrana interna para que esta modificación se lleve a cabo.

תתח

REFERENCIAS

תתח

1. Finlay, B. B., and Falkow, S. (1989) ***Salmonella as an intracellular parasite***. *Mol. Microbiol.* **3**, 1833–1841
2. Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S., and Selander, R. K. (1996) ***Molecular genetic relationships of the salmonellae***. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 804–808
3. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., and Swaminathan, B. (2000) ***Salmonella nomenclature***. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2465–7
4. Garai, P., Gnanadhas, D. P., and Chakravortty, D. (2012) ***Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms Revealing paradigm of host-pathogen interactions***
5. De Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., and Wiersinga, W. J. (2012) ***Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis***. *PLoS Pathog.* **8**, e1002933
6. Jones, B. D., and Falkow, S. (1996) ***Salmonellosis: Host Immune Responses and Bacterial Virulence***. *Annu. Rev. Immunol.*
7. Jones, B. D., Ghori, N., and Falkow, S. (1994) ***Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches***. *J. Exp. Med.* **180**, 15–23
8. Velge, P., Wiedemann, a, Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, a M., Grépinet, O., Namdari, F., Roche, S. M., Rossignol, a, and Virlogeux-Payant, I. (2012) ***Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis***. *Microbiologyopen.* **1**, 243–58
9. Vazquez-Torres, a, Jones-Carson, J., Bäumlér, a J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T., and Fang, F. C. (1999) ***Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes***. *Nature.* **401**, 804–808
10. Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., and Heffron, F. (1986) ***Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5189–93
11. Prost, L. R., Sanowar, S., and Miller, S. I. (2007) ***Salmonella sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages***. *Immunol. Rev.* **219**, 55–65
12. Mills, D. M., Bajaj, V., and Lee, C. A. (1995) ***A 40 kb chromosomal fragment encoding Salmonella typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the Escherichia coil K-12 chromosome***. **15**, 749–759
13. Galán, J. E. (1996) ***Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells***. *Mol. Microbiol.* **20**, 263–71
14. Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C., and Holden, D. W. (1998) ***Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages***. *Mol. Microbiol.* **30**, 163–74
15. Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., and Groisman, E. A. (1996) ***Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7800–7804

16. Hueck, C. J. (1998) ***Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants***. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433
17. Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E., Aizawa, S. I., Murray, A. W., Opina, C., Wells, W. A. E., Biol, T. C., Wang, X. M., Zhai, Y., Jr, J. E. F., Biol, J. C., Tamemoto, H., Chem, J. B., Heider, H., Hug, C., Lucocq, J. M., Bio-, E. J., Matsuda, S., Kawasaki, H., Moriguchi, T., Sagata, N., Watanabe, N., Vande, G. F., Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Gala, J. E., and Aizawa, S. I. (1998) ***Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system***. *Science*. **280**, 602–5
18. Manon, R., Nadia, A., Isabelle, V., and Philippe, V. (2008) ***The Different Strategies Used by Salmonella to Invade Host Cells***
19. Gong, H., Vu, G. P., Bai, Y., Yang, E., Liu, F., and Lu, S. (2010) ***Differential expression of Salmonella type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice***. *Microbiology*. **156**, 116–127
20. Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S., and Galyov, E. E. (2000) ***Identification of SopE2, a Salmonella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells***. *J. Bacteriol.* **182**, 2341–4
21. Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., and Galán, J. E. (1998) ***S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells***. *Cell*. **93**, 815–26
22. Zhou, D., Mooseker, M. S., and Gala, J. E. (2011) ***Role of the S. typhimurium Actin-Binding Protein SipA in Bacterial Internalization***. 10.1126/science.283.5410.2092
23. Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., and Galán, J. E. (2001) ***A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization***. *Mol. Microbiol.* **39**, 248–59
24. Galán, J. E. (1999) ***Interaction of Salmonella with host cells through the centisome 63 type III secretion system***. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 46–50
25. Lee, C. A., Silva, M., Siber, A. M., Kelly, A. J., Galyov, E., and McCormick, B. A. (2000) ***A secreted Salmonella protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12283–8
26. Brumell, J. H., and Grinstein, S. (2004) ***Salmonella redirects phagosomal maturation***. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 78–84
27. Steele-Mortimer, O., Brumell, J. H., Knodler, L. a, Méresse, S., Lopez, A., and Finlay, B. B. (2002) ***The invasion-associated type III secretion system of Salmonella enterica serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells***. *Cell. Microbiol.* **4**, 43–54
28. Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., and Holden, D. W. (1996) ***Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2593–7
29. Uchiya, K., Barbieri, M. a, Funato, K., Shah, a H., Stahl, P. D., and Groisman, E. a (1999) ***A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking***. *EMBO J.* **18**, 3924–33

30. Volkman, B. F., Lipson, D., Wemmer, D. E., and Kern, D. (2001) ***Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein.*** *Science*. **291**, 2429–2433
31. Van der Velden, A. W., Lindgren, S. W., Worley, M. J., and Heffron, F. (2000) ***Salmonella pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by Salmonella enterica serotype typhimurium.*** *Infect. Immun.* **68**, 5702–9
32. Beuzón, C. R., Méresse, S., Unsworth, K. E., Ruíz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E., and Holden, D. W. (2000) ***Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA.*** *EMBO J.* **19**, 3235–49
33. Méresse, S., Unsworth, K. E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martínez-Lorenzo, M. J., Waterman, S. R., Gorvel, J. P., and Holden, D. W. (2001) ***Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella.*** *Cell. Microbiol.* **3**, 567–77
34. Ruiz-Albert, J., Yu, X.-J., Beuzón, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E., and Holden, D. W. (2002) ***Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the Salmonella typhimurium vacuolar membrane.*** *Mol. Microbiol.* **44**, 645–61
35. Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2002) ***Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates.*** *J. Exp. Med.* **195**, 1155–66
36. Waterman, S. R., and Holden, D. W. (2003) ***Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system.*** *Cell. Microbiol.* **5**, 501–11
37. Freeman, J. a, Rappl, C., Kuhle, V., Hensel, M., and Miller, S. I. (2002) ***SpiC is required for translocation of Salmonella pathogenicity island 2 effectors and secretion of translocon proteins SseB and SseC.*** *Microbiology.* **184**, 4971–4980
38. Guy, R. L., Gonias, L. A., and Stein, M. A. (2000) ***Aggregation of host endosomes by Salmonella requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the fms-aroE intragenic region.*** *Mol. Microbiol.* **37**, 1417–35
39. Stein, M. A., Leung, K. Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F., and Finlay, B. B. (1996) ***Identification of a Salmonella virulence gene required for formation of filamentous structures within epithelial cells.*** *Mol. Microbiol.* **20**, 151–164
40. Groisman, E. A., and Heffron, F. (1995) ***Regulation of Salmonella virulence by two-component regulatory systems.*** in *Two-component signal transduction* (Hoch, J. A., and Silhavy, T. J. eds), pp. 319–332, ASM Press, Washington D.C.
41. Fahlen, T. F., Mathur, N., and Jones, B. D. (2000) ***Identification and characterization of mutants with increased expression of hila, the invasion gene transcriptional activator of Salmonella typhimurium.*** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 25–35
42. Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L., and Jones, B. D. (2003) ***HilE Interacts with HilD and Negatively Regulates hila Transcription and Expression of the Salmonella enterica Serovar Typhimurium Invasive Phenotype.*** **71**, 1295–1305
43. Baxter, M. A., and Jones, B. D. (2005) ***The fimYZ genes regulate Salmonella enterica Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility.*** *Infect. Immun.* **73**, 1377–85

44. Mascher, T., Helmann, J. D., and Uden, G. (2006) ***Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases.*** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–38
45. Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., and Ramos, J. L. (2010) ***Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals.*** *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 539–59
46. Parkinson, J. S., and Kofoid, E. C. (1992) ***Communication modules in bacterial signaling proteins.*** *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71–112
47. Hoch, J. A., and Varughese, K. I. (2001) ***Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction.*** *J. Bacteriol.* **183**, 4941–4949
48. Robinson, V. L., Buckler, D. R., and Stock, a M. (2000) ***A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch.*** *Nat. Struct. Biol.* **7**, 626–33
49. Perry, J., Koteva, K., and Wright, G. (2011) ***Receptor domains of two-component signal transduction systems.*** *Mol. Biosyst.* **7**, 1388–98
50. West, A. H., and Stock, A. M. (2001) ***Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.*** *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–76
51. Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010) ***The mechanism of signal transduction by two-component systems.*** *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 763–71
52. Perego, M., and Hoch, J. a (1996) ***Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems.*** *Trends Genet.* **12**, 97–101
53. Hoch, J. a (2000) ***Two-component and phosphorelay signal transduction.*** *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–70
54. Fabret, C., Feher, V. A., and Hoch, J. A. (1999) ***Two-component signal transduction in Bacillus subtilis: how one organism sees its world.*** *J. Bacteriol.* **181**, 1975–83
55. Wu, J., Ohta, N., and Newton, A. (1998) ***An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in Caulobacter.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1443–8
56. Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., and Saito, H. (1996) ***Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor.*** *Cell.* **86**, 865–75
57. Szurmant, H., White, R. a, and Hoch, J. a (2007) ***Sensor complexes regulating two-component signal transduction.*** *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 706–15
58. Milburn, M. V, Privé, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D. E., and Kim, S. H. (1991) ***Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand.*** *Science.* **254**, 1342–7
59. Cho, U. S., Bader, M. W., Amaya, M. F., Daley, M. E., Klevit, R. E., Miller, S. I., and Xu, W. (2006) ***Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling.*** *J. Mol. Biol.* **356**, 1193–206
60. Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., Bassler, B. L., and Hughson, F. M. (2006) ***Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing.*** *Cell.* **126**, 1095–1108

61. Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G., and Griesinger, C. (2003) ***The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of Escherichia coli.*** *J. Biol. Chem.* **278**, 39185–8
62. Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., and Madden, D. R. (2003) ***The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain.*** *J. Biol. Chem.* **278**, 39189–39196
63. Galperin, M. Y., Nikolskaya, a N., and Koonin, E. V (2001) ***Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems.*** *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21
64. Ho, Y. S., Burden, L. M., and Hurley, J. H. (2000) ***Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor.*** *EMBO J.* **19**, 5288–99
65. Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., and Coles, M. (2006) ***The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling.*** *Cell.* **126**, 929–40
66. Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E., and Bleecker, A. B. (1999) ***A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from Arabidopsis.*** *Science (80-).* **283**, 996–998
67. Mascher, T. (2014) ***Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases: signal transfer rather than stimulus perception.*** *Trends Microbiol.* 10.1016/j.tim.2014.05.006
68. Dutta, R., and Inouye, M. (2000) ***GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily.*** *Trends Biochem. Sci.* **25**, 24–28
69. Dutta, R., Qin, L., and Inouye, M. (1999) ***Histidine kinases: diversity of domain organization.*** *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640
70. Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., Yamazaki, T., Ono, A. M., Kainosho, M., Inouye, M., and Ikura, M. (1998) ***NMR structure of the histidine kinase domain of the E. coli osmosensor EnvZ.*** *Nature.* **396**, 88–92
71. Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M., and Ikura, M. (1999) ***Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ.*** *Nat. Struct. Biol.* **6**, 729–34
72. Marina, a, Mott, C., Auyzenberg, a, Hendrickson, W. a, and Waldburger, C. D. (2001) ***Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism.*** *J. Biol. Chem.* **276**, 41182–90
73. Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A. A., Xu, Z., and Ninfa, A. J. (2004) ***Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in Escherichia coli.*** *Biochemistry.* **43**, 6670–8

74. Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T., and Hakoshima, T. (1997) *Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB*. *Cell*. **88**, 717–23
75. Rogov, V. V., Bernhard, F., Löhr, F., and Dötsch, V. (2004) *Solution structure of the Escherichia coli YojN histidine-phosphotransferase domain and its interaction with cognate phosphoryl receiver domains*. *J. Mol. Biol.* **343**, 1035–48
76. Xu, Q., Porter, S. W., and West, A. H. (2003) *The yeast YPD1/SLN1 complex: insights into molecular recognition in two-component signaling systems*. *Structure*. **11**, 1569–81
77. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R., and Simon, M. I. (1999) *Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase*. *Cell*. **96**, 131–41
78. Varughese, K. I., Madhusudan, Zhou, X. Z., Whiteley, J. M., and Hoch, J. a (1998) *Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase*. *Mol. Cell*. **2**, 485–93
79. Bachhawat, P., and Stock, A. M. (2007) *Crystal structures of the receiver domain of the response regulator PhoP from Escherichia coli in the absence and presence of the phosphoryl analog beryllofluoride*. *J. Bacteriol.* **189**, 5987–95
80. Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., and Schirmer, T. (2007) *Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition*. *Structure*. **15**, 915–27
81. Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P., and Dickerson, R. E. (1996) *Structure of the Escherichia coli response regulator NarL*. *Biochemistry*. **35**, 11053–61
82. De Carlo, S., Chen, B., Hoover, T. R., Kondrashkina, E., Nogales, E., and Nixon, B. T. (2006) *The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC*. *Genes Dev*. **20**, 1485–1495
83. Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M., and West, A. H. (1998) *Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1381–6
84. Toro-Roman, A., Wu, T., and Stock, A. M. (2005) *A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR*. *Protein Sci.* **14**, 3077–88
85. Stock, J. B., Stock, A. M., and Mottonen, J. B. (1990) *Signal transduction in bacteria*. *Nature*
86. Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, a M., and Stock, J. B. (1992) *Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 718–722
87. McCleary, W. R., Stock, J. B., and Ninfa, A. J. (1993) *Is Acetyl Phosphate a Global Signal in Escherichia coli?*. *J. Bacteriol.* **175**, 2793–2798
88. Zapf, J. W., Hoch, J. a., and Whiteley, J. M. (1996) *A phosphotransferase activity of the Bacillus subtilis sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates*. *Biochemistry*. **35**, 2926–2933

89. Bobay, B. G., Hoch, J. a., and Cavanagh, J. (2012) ***Dynamics and activation in response regulators: the β 4- α 4 loop***. *Biomol. Concepts*. **3**, 175–182
90. Cuthbertson, L., and Nodwell, J. R. (2013) ***The TetR family of regulators***. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 440–75
91. Trajtenberg, F., Albanesi, D., Ruétalo, N., Botti, H., Mechaly, A. E., Nieves, M., Aguilar, P. S., Cybulski, L., Larrieux, N., de Mendoza, D., and Buschiazzi, A. (2014) ***Allosteric Activation of Bacterial Response Regulators: the Role of the Cognate Histidine Kinase Beyond Phosphorylation***. *MBio*. **5**, 1–12
92. Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W. W., Bader, M. W., De Smet, F., McClelland, M., Fang, F. C., De Moor, B., Vanderleyden, J., and Marchal, K. (2005) ***Comparison of the PhoPQ regulon in Escherichia coli and Salmonella typhimurium***. *J. Mol. Evol.* **60**, 462–74
93. Mettke, I., Fiedler, U., and Weiss, V. (1995) ***Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity***. *J. Bacteriol.* **177**, 5056–5061
94. Wilson, S. A., Wachira, S. J., Norman, R. A., Pearl, L. H., and Drew, R. E. (1996) ***Transcription antitermination regulation of the Pseudomonas aeruginosa amidase operon***. *EMBO J.* **15**, 5907–16
95. Scharf, B. E., Fahrner, K. a, Turner, L., and Berg, H. C. (1998) ***Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 201–206
96. Saxl, R. L., Anand, G. S., and Stock, A. M. (2001) ***Synthesis and biochemical characterization of a phosphorylated analogue of the response regulator CheB***. *Biochemistry*. **40**, 12896–903
97. D'Argenio, D. A., and Miller, S. I. (2004) ***Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger***. *Microbiology*. **150**, 2497–502
98. Castelli, M. E., García Véscovi, E., and Soncini, F. C. (2000) ***The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in Salmonella***. *J. Biol. Chem.* **275**, 22948–54
99. Soncini, F. C., García Véscovi, E., Solomon, F., and Groisman, E. a (1996) ***Molecular basis of the magnesium deprivation response in Salmonella typhimurium: identification of PhoP-regulated genes***. *J. Bacteriol.* **178**, 5092–9
100. Lejona, S., Cabeza, M. L., Ve, E. G., and Soncini, F. C. (2003) ***Molecular Characterization of the Mg²⁺-Responsive PhoP-PhoQ Regulon in Salmonella enterica***. **185**, 6287–6294
101. García Véscovi, E., Soncini, F. C., and Groisman, E. A. (1996) ***Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence***. *Cell*. **84**, 165–74
102. Groisman, E. A. (1998) ***The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal***. *Bioessays*. **20**, 96–101
103. Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., and Miller, S. I. (1998) ***PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance***. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171–82

104. Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M., and Miller, S. I. (1997) **Regulation of Lipid A Modifications by Salmonella typhimurium Virulence Genes *phoP-phoQ***. *Science (80-.)*. **276**, 250–253
105. Aguirre, A., Cabeza, M. L., Spinelli, S. V., McClelland, M., García Véscovi, E., and Soncini, F. C. (2006) ***PhoP-induced genes within Salmonella pathogenicity island 1***. *J. Bacteriol.* **188**, 6889–98
106. Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., and Hensel, M. (1999) **Environmental regulation of Salmonella pathogenicity island 2 gene expression**. *Mol. Microbiol.* **31**, 1759–1773
107. Osborne, S. E., and Coombes, B. K. (2011) **Transcriptional priming of Salmonella Pathogenicity Island-2 precedes cellular invasion**. *PLoS One.* **6**, e21648
108. García-del Portillo, F., Núñez-Hernández, C., Eisman, B., and Ramos-Vivas, J. (2008) **Growth control in the Salmonella-containing vacuole**. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 46–52
109. Thompson, J. a, Liu, M., Helaine, S., and Holden, D. W. (2011) **Contribution of the PhoP/Q regulon to survival and replication of Salmonella enterica serovar Typhimurium in macrophages**. *Microbiology.* **157**, 2084–93
110. Watson, K. G., and Holden, D. W. (2010) **Dynamics of growth and dissemination of Salmonella in vivo**. *Cell. Microbiol.* **12**, 1389–97
111. Fields, P. I., Groisman, E. A., and Heffron, F. (1989) **A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells**. *Science.* **243**, 1059–62
112. Kier, L. D., Weppelman, R., and Ames, B. N. (1977) **Regulation of two phosphatases and a cyclic phosphodiesterase of Salmonella typhimurium**. *J. Bacteriol.* **130**, 420–8
113. Groisman, E. A. (2001) **The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ**. **183**, 1835–1842
114. Zwir, I., Shin, D., Kato, A., Nishino, K., Latifi, T., Solomon, F., Hare, J. M., Huang, H., and Groisman, E. a (2005) **Dissecting the PhoP regulatory network of Escherichia coli and Salmonella enterica**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2862–7
115. Gooderham, W. J., Gellatly, S. L., Sanschagrin, F., McPhee, J. B., Bains, M., Cosseau, C., Levesque, R. C., and Hancock, R. E. W. (2009) **The sensor kinase PhoQ mediates virulence in Pseudomonas aeruginosa**. *Microbiology.* **155**, 699–711
116. Grabenstein, J. P., Fukuto, H. S., Palmer, L. E., and Bliska, J. B. (2006) **Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of Yersinia pestis in macrophages**. *Infect. Immun.* **74**, 3727–41
117. Aranda, C. M. A., Swansont, J. A., Loomis, W. P., and Miller, S. I. (1992) **Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes**. **89**, 10079–10083
118. Miller, S. I., Kukral, a M., and Mekalanos, J. J. (1989) **A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls Salmonella typhimurium virulence**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5054–8
119. Miller, S. I., and Mekalanos, J. J. (1990) **Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates Salmonella virulence and survival within macrophages**. *J. Bacteriol.* **172**, 2485–90

120. Kier, L. D., Weppelman, R. M., and Ames, B. N. (1979) ***Regulation of nonspecific acid phosphatase in Salmonella: *phoN* and *phoP* genes.*** *J. Bacteriol.* **138**, 155–61
121. Behlau, I., and Miller, S. I. (1993) ***A PhoP-repressed gene promotes Salmonella typhimurium invasion of epithelial cells.*** *J. Bacteriol.* **175**, 4475–84
122. Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. a, and Miller, S. I. (1994) ***Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes.*** *J. Exp. Med.* **179**, 601–608
123. Belden, W. J., and Miller, S. I. (1994) ***Further characterization of the PhoP regulon: identification of new PhoP-activated virulence loci.*** *Infect. Immun.* **62**, 5095–101
124. Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hentschel, U., Govantes, F., Hanna, P. C., and Mahan, M. J. (1999) ***Coordinate intracellular expression of Salmonella genes induced during infection.*** *J. Bacteriol.* **181**, 799–807
125. Soncini, F. C., Vescovi, E. G., and Groisman, E. a (1995) ***Transcriptional autoregulation of the Salmonella typhimurium *phoPQ* operon.*** *J. Bacteriol.* **177**, 4364–71
126. Gunn, J. S., and Miller, S. I. (1996) ***PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in Salmonella typhimurium antimicrobial peptide resistance.*** *J. Bacteriol.* **178**, 6857–64
127. Soncini, F. C., and Groisman, E. a (1996) ***Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals.*** *J. Bacteriol.* **178**, 6796–801
128. Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J., and Groisman, E. a. (2004) ***The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in Salmonella enterica.*** *J. Bacteriol.* **186**, 4124–4133
129. Kox, L. F., Wösten, M. M., and Groisman, E. a (2000) ***A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system.*** *EMBO J.* **19**, 1861–72
130. Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., and Miller, S. I. (1998) ***Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides.*** *Cell.* **95**, 189–98
131. Gunn, J. S., Alpuche-Aranda, C. M., Loomis, W. P., Belden, W. J., and Miller, S. I. (1995) ***Characterization of the Salmonella typhimurium *pagC/pagD* chromosomal region.*** *J. Bacteriol.* **177**, 5040–7
132. Gibbons, H. S., Lin, S., Cotter, R. J., and Raetz, C. R. (2000) ***Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in Salmonella typhimurium lipid A. Function of *LpxO*, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue.*** *J. Biol. Chem.* **275**, 32940–9
133. Trent, M. S., Pabich, W., Raetz, C. R., and Miller, S. I. (2001) ***A PhoP/PhoQ-induced Lipase (*PagL*) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of Salmonella typhimurium.*** *J. Biol. Chem.* **276**, 9083–92
134. Hilbert, F., García-del Portillo, F., and Groisman, E. A. (1999) ***A periplasmic D-alanyl-D-alanine dipeptidase in the gram-negative bacterium Salmonella enterica.*** *J. Bacteriol.* **181**, 2158–65

135. Brodsky, I. E., Ghori, N., Falkow, S., and Monack, D. (2005) ***Mig-14 is an inner membrane-associated protein that promotes Salmonella typhimurium resistance to CRAMP, survival within activated macrophages and persistent infection.*** *Mol. Microbiol.* **55**, 954–72
136. Gunn, J. S., Belden, W. J., and Miller, S. I. (1998) ***Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the Salmonella typhimurium chromosome.*** *Microb. Pathog.* **25**, 77–90
137. Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S. I. (2000) ***A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides.*** *J. Bacteriol.* **182**, 4077–86
138. Bijlsma, J. J. E., and Groisman, E. a (2005) ***The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica.*** *Mol. Microbiol.* **57**, 85–96
139. Cabeza, M. L., Aguirre, A., Soncini, F. C., and Vescovi, E. G. (2007) ***Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in Salmonella enterica.*** *J. Bacteriol.* **189**, 7335–42
140. Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., and Miller, S. I. (2005) ***Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase.*** *Cell.* **122**, 461–72
141. Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C., and Lee, C. a (1996) ***Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hila expression.*** *Mol. Microbiol.* **22**, 703–14
142. Tao, T., Snavely, M. D., Farr, S. G., and Maguire, M. E. (1995) ***Magnesium transport in Salmonella typhimurium: mgtA encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg²⁺ in a manner similar to that of the mgtB P-type ATPase.*** *J. Bacteriol.* **177**, 2654–62
143. Valdivia, R. H. (1997) ***Fluorescence-Based Isolation of Bacterial Genes Expressed Within Host Cells.*** *Science (80-.).* **277**, 2007–2011
144. Garvis, S. G., Beuzón, C. R., and Holden, D. W. (2001) ***A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and Salmonella-containing vacuoles in macrophages.*** *Cell. Microbiol.* **3**, 731–44
145. Wick, M. J., Harding, C. V, Twesten, N. J., Normark, S. J., and Pfeifer, J. D. (1995) ***The phoP locus influences processing and presentation of Salmonella typhimurium antigens by activated macrophages.*** *Mol. Microbiol.* **16**, 465–76
146. Pilonieta, M. C., Erickson, K. D., Ernst, R. K., and Detweiler, C. S. (2009) ***A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC.*** *J. Bacteriol.* **191**, 7243–52
147. Wösten, M. M., Kox, L. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C., and Groisman, E. a (2000) ***A signal transduction system that responds to extracellular iron.*** *Cell.* **103**, 113–25
148. Tamayo, R., Ryan, S. S., Mccoy, A. J., and Gunn, J. S. (2002) ***Identification and Genetic Characterization of PmrA-Regulated Genes and Genes Involved in Polymyxin B Resistance in Salmonella enterica Serovar Typhimurium.*** **70**, 6770–6778

149. Moon, K., and Gottesman, S. (2009) *A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of Escherichia coli to antimicrobial peptides*. *Mol. Microbiol.* **74**, 1314–30
150. Overgaard, M., Kallipolitis, B., and Valentin-Hansen, P. (2009) *Modulating the bacterial surface with small RNAs: a new twist on PhoP/Q-mediated lipopolysaccharide modification*. *Mol. Microbiol.* **74**, 1289–94
151. Cheung, J., Bingman, C. a, Reyngold, M., Hendrickson, W. a, and Waldburger, C. D. (2008) *Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain*. *J. Biol. Chem.* **283**, 13762–70
152. García Véscovi, E., Ayala, Y. M., Di Cera, E., and Groisman, E. A. (1997) *Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺*. *J. Biol. Chem.* **272**, 1440–3
153. Waldburger, C. D., and Sauer, R. T. (1996) *Signal Detection by the PhoQ Sensor-Transmitter. Characterization of the sensor domain and a response-impaired mutant that indentifies ligand-binding determinants*. *J. Biol. Chem.* **271**, 26630–26636
154. Reinhart, R. A. (1988) *Magnesium metabolism. A review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels*. *Arch. Intern. Med.* **148**, 2415–20
155. Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., Maguire, M. E., and Finlay, B. B. (1992) *Characterization of the micro-environment of Salmonella typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells*. *Mol. Microbiol.* **6**, 3289–97
156. Pollack, C., Straley, S. C., and Klempner, M. S. *Probing the phagolysosomal environment of human macrophages with a Ca²⁺-responsive operon fusion in Yersinia pestis*. *Nature.* **322**, 834–6
157. Merighi, M., Ellermeier, C. D., Slauch, J. M., and Gunn, J. S. (2005) *Resolvase-In Vivo Expression Technology Analysis of the Salmonella enterica Serovar Typhimurium PhoP and PmrA Regulons in BALB / c Mice †*. **187**, 7407–7416
158. Miller, S. I., Ernst, R. K., and Bader, M. W. (2005) *LPS, TLR4 and infectious disease diversity*. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 36–46
159. Martin-orozco, N., Touret, N., Zaharik, M. L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., Finlay, B. B., Gros, P., and Grinstein, S. (2006) *Visualization of Vacuolar Acidification-induced Transcription of Genes of Pathogens inside Macrophages □*. **17**, 498–510
160. Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., Fang, F. C., and Miller, S. I. (2003) *Regulation of Salmonella typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides*. *Mol. Microbiol.* **50**, 219–230
161. Prost, L. R., and Miller, S. I. (2008) *The Salmonellae PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals*. *Cell. Microbiol.* **10**, 576–82
162. Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., and Miller, S. I. (2007) *Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH*. *Mol. Cell.* **26**, 165–74

163. Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., and Utsumi, R. (2010) **Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria.** *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 232–9
164. Stephenson, K., and Hoch, J. A. (2004) **Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms.** *Curr. Med. Chem.* **11**, 765–73
165. Stephenson, K., Yamaguchi, Y., and Hoch, J. a (2000) **The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems.** *J. Biol. Chem.* **275**, 38900–4
166. Matsushita, M., and Janda, K. D. (2002) **Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents.** *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 855–67
167. Hilliard, J. J., Goldschmidt, R. M., Licata, L., Baum, E. Z., and Bush, K. (1999) **Multiple mechanisms of action for inhibitors of histidine protein kinases from bacterial two-component systems.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1693–9
168. Ramström, H., Bourotte, M., Philippe, C., Schmitt, M., Haiech, J., and Bourguignon, J.-J. (2004) **Heterocyclic bis-cations as starting hits for design of inhibitors of the bifunctional enzyme histidine-containing protein kinase/phosphatase from *Bacillus subtilis*.** *J. Med. Chem.* **47**, 2264–75
169. Gilmour, R., Foster, J. E., Sheng, Q., McClain, J. R., Riley, A., Sun, P., Ng, W., Yan, D., Nicas, T. I., Henry, K., and Winkler, M. E. (2005) **New Class of Competitive Inhibitor of Bacterial Histidine Kinases.** *J. Bacteriol.* **187**, 8196–8200
170. Qin, Z., Zhang, J., Xu, B., Chen, L., Wu, Y., Yang, X., Shen, X., Molin, S., Danchin, A., Jiang, H., and Qu, D. (2006) **Structure-based discovery of inhibitors of the YycG histidine kinase: new chemical leads to combat *Staphylococcus epidermidis* infections.** *BMC Microbiol.* **6**, 96
171. Eguchi, Y., Kubo, N., Matsunaga, H., Igarashi, M., and Utsumi, R. (2011) **Development of an antivirulence drug against *Streptococcus mutans*: Repression of biofilm formation, acid tolerance, and competence by a histidine kinase inhibitor, walkmycin C.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1475–1484
172. Guarnieri, M. T., Zhang, L., Shen, J., and Zhao, R. (2008) **The Hsp90 inhibitor radicicol interacts with the ATP-binding pocket of bacterial sensor kinase PhoQ.** *J. Mol. Biol.* **379**, 82–93
173. Cai, X., Zhang, J. J., Chen, M., Wu, Y., Wang, X., Chen, J., Zhang, J. J., Shen, X., Qu, D., and Jiang, H. (2011) **The effect of the potential PhoQ histidine kinase inhibitors on *Shigella flexneri* virulence.** *PLoS One.* **6**, e23100
174. Spainhour, C. B. (2005) **Natural products.** in *Drug Discovery Handbook*, by Shayne Cox Gad, 10.3184/003685010X12626983776947
175. Tulp, M., and Bohlin, L. (2004) **Unconventional natural sources for future drug discovery.** *Drug Discov. Today.* **9**, 450–8
176. Koch, M. A., Schuffenhauer, A., Scheck, M., Wetzels, S., Casaulta, M., Odermatt, A., Ertl, P., and Waldmann, H. (2005) **Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP).** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17272–7

177. Ortholand, J. Y., and Ganesan, a. (2004) **Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 271–280
178. Floss, H. G. (2006) **Combinatorial biosynthesis--potential and problems.** *J. Biotechnol.* **124**, 242–57
179. Weismann, K. J., and Leadlay, P. F. (2005) **Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides.** *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 925–936
180. Zhang, C., Weller, R. L., Thorson, J. S., and Rajsiki, S. R. (2006) **Natural product diversification using a non-natural cofactor analogue of S-adenosyl-L-methionine.** *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2760–2761
181. Cowan, M. M. (1999) **Plant products as antimicrobial agents.** *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564–82
182. Lam, K. S. (2007) **New aspects of natural products in drug discovery.** *Trends Microbiol.* **15**, 279–289
183. López, S. N., Ramallo, I. A., Sierra, M. G., Zacchino, S. a, Furlan, R. L. E., Salazar, M. O., Mendez, L., and Furlan, R. L. E. (2007) **Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 441–4
184. Mariela I. Sciara (2010) *Sistemas de transducción de señales en patógenos bacterianos*
185. Ramallo, I. A., Zacchino, S. A., and Furlan, R. L. E. **A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers.** *Phytochem. Anal.* **17**, 15–9
186. Salazar, M. O., and Furlan, R. L. E. **A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors.** *Phytochem. Anal.* **18**, 209–12
187. Salazar, M. O., Viarengo, G., Sciara, M. I., Kieffer, P. M., Garcia Vescovi, E., and Furlan, R. L. E. (2014) **A Thin-layer Chromatography Autographic Method for the Detection of Inhibitors of the Salmonella PhoP-PhoQ Regulatory System.** *Phytochem. Anal.* **25**, 155–60
188. Long, B. Y., Fatty, C., Dirussos, C. C., Heimert, L., and Metzger, A. K. (1992) **Characterization of FadR , a Global Transcriptional Regulator of Fatty Acid Metabolism in Escherichia coli.** **267**, 8685–8691
189. Iram, S. H., and Cronan, J. E. (2006) **The β -Oxidation Systems of Escherichia coli and Salmonella enterica Are Not Functionally Equivalent.** **188**, 599–608
190. Black, P. N., and Dirusso, C. C. (2003) **Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids : Proteins , Enzymes , and Vectorial Esterification.** **67**, 454–472
191. Dirusso, C. C., and Black, P. N. (2004) **Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system.** *J. Biol. Chem.* **279**, 49563–6
192. Weimar, J. D., DiRusso, C. C., Delio, R., and Black, P. N. (2002) **Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of Escherichia coli FadD are required for enzyme activity and fatt.** *J. Biol. Chem.* **277**, 29369–76

193. Campbell, J. W., and Cronan, J. E. (2002) ***The enigmatic Escherichia coli fadE gene is yaffH***. *J. Bacteriol.* **184**, 3759–64
194. Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K. (2007) ***Regulation of fatty acid metabolism in bacteria***. *Mol. Microbiol.* **66**, 829–839
195. Campbell, J. W. (2001) ***Escherichia coli FadR Positively Regulates Transcription of the fabB Fatty Acid Biosynthetic Gene***. **183**, 5982–5990
196. Henry, M. F., and Cronan, J. E. (1991) ***Escherichia coli transcription factor that both activates fatty acid synthesis and represses fatty acid degradation***. *J. Mol. Biol.* **222**, 843–9
197. Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., Krishnamurthy, R., Eisner, R., Gautam, B., Young, N., Knox, C., Dong, E., Huang, P., Hollander, Z., Pedersen, T. L., Steven, R., Bamforth, F., Greiner, R., Mcmanus, B., Newman, J. W., Goodfriend, T., and Wishart, D. S. (2011) ***The Human Serum Metabolome***. 10.1371/journal.pone.0016957
198. Devillard, E., Mcintosh, F. M., Duncan, S. H., and Wallace, R. J. (2007) ***Metabolism of Linoleic Acid by Human Gut Bacteria: Different Routes for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid***. **189**, 2566–2570
199. Barrett, E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2007) ***Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures***. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2333–7
200. Jiménez, E., Villar-Tajadura, M. A., Marín, M., Fontecha, J., Requena, T., Arroyo, R., Fernández, L., and Rodríguez, J. M. (2012) ***Complete genome sequence of Bifidobacterium breve CECT 7263, a strain isolated from human milk***. *J. Bacteriol.* **194**, 3762–3
201. Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S., and Leroy, F. (2012) ***Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains***. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 234–40
202. Banni, S., Angioni, E., Murru, E., Carta, G., Melis, M. P., Bauman, D., Dong, Y., and Ip, C. (2001) ***Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland***. *Nutr. Cancer.* **41**, 91–7
203. Hori, Y., Nakamura, K., Yamamoto, M., Shimada, K., Nakadaira, H., Shibuya, N., Endoh, K., and Ogoshi, K. (1998) ***Determination of Free Fatty Acids in Human Bile by High-Performance Liquid Chromatography***. *Ann. Clin. Biochem. An Int. J. Biochem. Lab. Med.* **35**, 279–282
204. Gunn, J. S. (2000) ***Mechanisms of bacterial resistance and response to bile***
205. Rychlik, I., and Barrow, P. a (2005) ***Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection***. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 1021–40
206. Van Velkinburgh, J. C., and Gunn, J. S. (1999) ***PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in Salmonella spp.*** *Infect. Immun.* **67**, 1614–22

207. Ramos-Morales, F., Prieto, A. I., Beuzón, C. R., Holden, D. W., and Casadesús, J. (2003) ***Role for Salmonella enterica enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence.*** *J. Bacteriol.* **185**, 5328–32
208. Paul, S., Alegre, K. O., Holdsworth, S. R., Rice, M., Brown, J. a, McVeigh, P., Kelly, S. M., and Law, C. J. (2014) ***A single-component multidrug transporter of the major facilitator superfamily is part of a network that protects Escherichia coli from bile salt stress.*** *Mol. Microbiol.* **92**, 872–84
209. Prouty, a M., and Gunn, J. S. (2000) ***Salmonella enterica serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile.*** *Infect. Immun.* **68**, 6763–9
210. Heithoff, D. M., Conner, C. P., and Mahan, M. J. (1997) ***Dissecting the biology of a pathogen during infection.*** *Trends Microbiol.* **5**, 509–13
211. Utley, M., Franklin, D. P., Krogfelt, K. A., Laux, D. C., and Cohen, P. S. (1998) ***A Salmonella typhimurium mutant unable to utilize fatty acids and citrate is avirulent and immunogenic in mice.*** *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 129–34
212. Spector, M. P., DiRusso, C. C., Pallen, M. J., Garcia del Portillo, F., Dougan, G., and Finlay, B. B. (1999) ***The medium-/long-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase (fadF) gene of Salmonella typhimurium is a phase 1 starvation-stress response (SSR) locus.*** *Microbiology.* **145 (Pt 1)**, 15–31
213. Lucas, R. L., Lostroh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L., and Lee, C. a (2000) ***Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in Salmonella enterica serovar typhimurium.*** *J. Bacteriol.* **182**, 1872–82
214. Golubeva, Y. a, Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R., and Slauch, J. M. (2012) ***Integrating global regulatory input into the Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system.*** *Genetics.* **190**, 79–90
215. Lesley, J. A., and Waldburger, C. D. (2003) ***Repression of Escherichia coli PhoP-PhoQ Signaling by Acetate Reveals a Regulatory Role for Acetyl Coenzyme A.*** **185**, 2563–2570
216. Viarengo, G., Sciara, M. I., Salazar, M. O., Kieffer, P. M., Furlán, R. L. E., and García Vescovi, E. (2013) ***Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the Salmonella enterica PhoP/PhoQ regulatory system.*** *J. Biol. Chem.* **288**, 22346–58
217. Villarejo, M. R., and Zabin, I. (1974) ***Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains.*** *J. Bacteriol.* **120**, 466–74
218. Castelli, M. E., Cauherff, A., Amongero, M., Soncini, F. C., and Vescovi, E. G. (2003) ***The H box-harboring domain is key to the function of the Salmonella enterica PhoQ Mg2+-sensor in the recognition of its partner PhoP.*** *J. Biol. Chem.* **278**, 23579–85
219. Datsenko, K. a, and Wanner, B. L. (2000) ***One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–5
220. Beaber, J. W., Hochhut, B., and Waldor, M. K. (2002) ***Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from Vibrio cholerae.*** *J. Bacteriol.* **184**, 4259–69
221. Murakami, K., Chan, S. Y., and Routtenberg, A. (1986) ***Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca2+ and phospholipids.*** *J. Biol. Chem.* **261**, 15424–9

222. Raleigh, J. A., Kremers, W., and Gaboury, B. (1977) ***Dose-rate and Oxygen Effects in Models of Lipid Membranes: Linoleic Acid***. *Int. J. Radiat. Biol.* **31**, 203–213
223. Green, M. R., and Sambrook, J. (2013) *Molecular cloning - A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 10.3724/SP.J.1141.2012.01075
224. Davis, R. W., Bolstein, D., and Roth, J. R. (1980) *Advanced bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
225. Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
226. Laemmli, U. K. (1970) ***Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4***. *Nature.* **227**, 680–5
227. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) ***NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis***. *Nat. Methods.* **9**, 671–5
228. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) ***A rapid method of total lipid extraction and purification***. *Can.J.Biochem.Physiol.* **37**, 911–917
229. Ortega, A. D., Gonzalo-Asensio, J., and García-del Portillo, F. (2012) ***Dynamics of Salmonella small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells***. *RNA Biol.* **9**, 469–88
230. Mariscotti, J. F., and Garci, F. (2009) ***Genome Expression Analyses Revealing the Modulation of the Salmonella Rcs Regulon by the Attenuator IgaA*** *†*. **191**, 1855–1867
231. Smyth, G. K., and Speed, T. (2003) ***Normalization of cDNA microarray data***. *Methods.* **31**, 265–73
232. Oliveros, J. C. (2007) ***FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates***
233. Oliveros, J. ***VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams***. *BioinfoGP, CNB-CSIC*
234. Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994) ***Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers***. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **2**, 28–36
235. Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., and Li, W. W. (2006) ***MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs***. *Nucleic Acids Res.* **34**, W369–73
236. Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., and Noble, W. S. (2009) ***MEME SUITE: tools for motif discovery and searching***. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–8
237. Bailey, T. L., and Gribskov, M. (1998) ***Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches***. *Bioinformatics.* **14**, 48–54
238. Kishii, R., Falzon, L., Yoshida, T., Kobayashi, H., and Inouye, M. (2007) ***Structural and functional studies of the HAMP domain of EnvZ, an osmosensing transmembrane histidine kinase in Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* **282**, 26401–8

239. Yoshida, T., Phadtare, S., and Inouye, M. (2007) **Functional and structural characterization of EnvZ, an osmosensing histidine kinase of *E. coli***. *Methods Enzymol.* **423**, 184–202
240. Cronan, J. E. (1996) **Two carbon compounds and fatty acids as carbon sources**. in *Escherichia coli and Salmonella* (Neidhardt, F. C. ed), pp. 343–357, ASM Press, Washington, D.C.
241. Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2008) **Membrane lipid homeostasis in bacteria**. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 222–33
242. Rock, C. O., and Jackowski, S. (1985) **Pathways for the incorporation of exogenous fatty acids into phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* **260**, 12720–4
243. Jackowski, S., and Rock, C. O. (1986) **Transfer of fatty acids from the 1-position of phosphatidylethanolamine to the major outer membrane lipoprotein of *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* **261**, 11328–33
244. Jackowski, S., Jackson, P. D., and Rock, C. O. (1994) **Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* **269**, 2921–2928
245. Pech-Canul, Á., Nogales, J., Miranda-Molina, A., Álvarez, L., Geiger, O., Soto, M. J., and López-Lara, I. M. (2011) ***FadD* is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids**. *J. Bacteriol.* **193**, 6295–304
246. Goldberg, S. D., Clinthorne, G. D., Goulian, M., and DeGrado, W. F. (2010) **Transmembrane polar interactions are required for signaling in the *Escherichia coli* sensor kinase *PhoQ***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8141–6
247. Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., and De Mendoza, D. (2001) **Molecular basis of thermosensing: A two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis***. *EMBO J.* **20**, 1681–1691
248. Cybulski, L. E., Albanesi, D., Mansilla, M. C., Altabe, S., Aguilar, P. S., and De Mendoza, D. (2002) **Mechanism of membrane fluidity optimization: Isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase**. *Mol. Microbiol.* **45**, 1379–1388
249. Albanesi, D., Mansilla, M. C., and Mendoza, D. De (2004) **The Membrane Fluidity Sensor *DesK* of *Bacillus subtilis* Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator**. *J. Bacteriol.* **186**, 2655–2663
250. Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., de Mendoza, D., and Buschiazzi, A. (2009) **Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16185–90
251. Chatterjee, A., Dutta, P. K., and Chowdhury, R. (2007) **Effect of fatty acids and cholesterol present in bile on expression of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae***. *Infect. Immun.* **75**, 1946–53
252. Lowden, M. J., Skorupski, K., Pellegrini, M., Chiorazzo, M. G., Taylor, R. K., and Kull, F. J. (2010) **Structure of *Vibrio cholerae* *ToxT* reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2860–5

253. Antunes, L. C. M., Wang, M., Andersen, S. K., Ferreira, R. B. R., Kappelhoff, R., Han, J., Borchers, C. H., and Finlay, B. B. (2012) **Repression of *Salmonella enterica* *phoP* expression by small molecules from physiological bile.** *J. Bacteriol.* **194**, 2286–96
254. Saito, A., Nakamura, K., Hori, Y., and Yamamoto, M. (2000) **Effects of Capsaicin on Biliary Free Fatty Acids in Rats.** **70**, 19–23
255. Bumgarner, R. (2013) **Unit 22.1: Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future.** in *Current Protocols in Molecular Biology*, 10.1002/0471142727.mb2201s101.DNA
256. Van Vliet, A. H. M. (2010) **Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities.** *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 1–7
257. Kogenaru, S., Qing, Y., Guo, Y., and Wang, N. (2012) **RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling.** *BMC Genomics.* **13**, 629
258. Bailey, T. L. (2002) **Discovering novel sequence motifs with MEME.** *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **Chapter 2**, Unit 2.4
259. Reitzer, L., and Schneider, B. L. (2001) **Metabolic Context and Possible Physiological Themes of *S54* -Dependent Genes in *Escherichia coli*.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 422–444
260. Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, a B., Peter, B. J., Bender, R. a, and Kustu, S. (2000) **Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14674–9
261. Schneider, B. L., Ruback, S., Kiupakis, A. K., Kasbarian, H., Pybus, C., and Reitzer, L. (2002) **The *Escherichia coli* *gabDTPC* Operon: Specific gamma-Aminobutyrate Catabolism and Nonspecific Induction.** *J. Bacteriol.* **184**, 6976–6986
262. Schneider, B. L., Kiupakis, A. K., and Reitzer, L. J. (1998) **Arginine Catabolism and the Arginine Succinyltransferase Pathway in *Escherichia coli*.** **180**, 4278–4286
263. Fraley, C. D., Kim, J. H., P, M. M., and Matin, A. (1998) **The *Escherichia coli* Starvation Gene *cstC* Is Involved in Amino Acid Catabolism.** *J. Bacteriol.* **180**, 4287–4290
264. Kiupakis, A. K., and Reitzer, L. (2002) **ArgR-Independent Induction and ArgR-Dependent Superinduction of the *astCADBE* Operon in *Escherichia coli*.** **184**, 2940–2950
265. Ninfa, A. J., and Magasanik, B. (1986) **Covalent modification of the *glnG* product, *NRI*, by the *glnL* product, *NRII*, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5909–5913
266. Lu, C., and Abdelal, A. T. (1999) **Role of ArgR in Activation of the *ast* Operon , Encoding Enzymes of the Arginine Succinyltransferase Pathway in *Salmonella typhimurium*.** **181**, 1934–1938
267. Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S. K., Hammarlöf, D. L., Canals, R., Grissom, J. E., Conway, T., Hokamp, K., and Hinton, J. C. D. (2013) **An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.** *Cell Host Microbe.* **14**, 683–95

268. Schellenberg, G. D., and Furlong, C. E. (1977) **Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* **252**, 9055–64
269. Muse, W. B., and Bender, R. A. (1998) **The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* **180**, 1166–73
270. Bacon, D. F., and Vogel, H. J. (1963) **A regulatory gene simultaneously involved in repression and induction**. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **28**, 437–438
271. Hosie, A. H., Allaway, D., Jones, M. A., Walshaw, D. L., Johnston, A. W., and Poole, P. S. (2001) **Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake**. *Mol. Microbiol.* **40**, 1449–59
272. Kustu, S. G., Mcfarland, N. C., Hui, S. P., Esmon, B., and Ames, G. F. (1979) **Nitrogen Control in *Salmonella typhimurium*: Co-Regulation of Synthesis of Glutamine Synthetase and Amino Acid Transport Systems**. **138**, 218–234
273. Choi, Y., Choi, J., Groisman, E. a, Kang, D.-H., Shin, D., and Ryu, S. (2012) **Expression of STM4467-encoded arginine deiminase controlled by the STM4463 regulator contributes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence**. *Infect. Immun.* **80**, 4291–7
274. Casiano-Colón, A., and Marquis, R. E. (1988) **Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance**. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1318–24
275. Degan, B. A., Fontaine, M. C., Doebereiner, A. H., Lee, J. J., Mastroeni, P., Dougan, G., Goodacre, J. A., and Kehoe, M. A. (2000) **Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein**. *Infect. Immun.* **68**, 2441–8
276. Shah, P., and Swiatlo, E. (2008) **A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens**. *Mol. Microbiol.* **68**, 4–16
277. Hoiseth, S. K., and Stocker, B. A. (1981) **Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines**. *Nature.* **291**, 238–9
278. Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001) **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition**. *Biochem. J.* **357**, 593–615
279. Mori, M., and Gotoh, T. (2004) **Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection**. *J. Nutr.* **134**, 2820S–2825S; discussion 2853S
280. Stevens, B. R., Kakuda, D. K., Yu, K., Waters, M., Vo, C. B., and Raizada, M. K. (1996) **Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes**. *J. Biol. Chem.* **271**, 24017–22
281. Witthöft, T., Eckmann, L., Kim, J. M., and Kagnoff, M. F. (1998) **Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells**. *Am. J. Physiol.* **275**, G564–71
282. Malladi, V., Puthenedam, M., Williams, P. H., and Balakrishnan, A. (2004) **Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-kappaB and MAP kinases**. *Inflammation.* **28**, 345–53

283. Fang, F. C. (2004) ***Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies***. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–32
284. Dijkstra, G., van Goor, H., Jansen, P. L. M., and Moshage, H. (2004) ***Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract***. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **5**, 529–36
285. Gobert, A. P., McGee, D. J., Akhtar, M., Mendz, G. L., Newton, J. C., Cheng, Y., Mobley, H. L., and Wilson, K. T. (2001) ***Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13844–9
286. Peteroy-Kelly, M., Venketaraman, V., and Connell, N. D. (2001) ***Effects of Mycobacterium bovis BCG infection on regulation of L-arginine uptake and synthesis of reactive nitrogen intermediates in J774.1 murine macrophages***. *Infect. Immun.* **69**, 5823–31
287. Talaue, M. T., Venketaraman, V., Hazbón, M. H., Peteroy-Kelly, M., Seth, A., Colangeli, R., Alland, D., and Connell, N. D. (2006) ***Arginine homeostasis in J774.1 macrophages in the context of Mycobacterium bovis BCG infection***. *J. Bacteriol.* **188**, 4830–40
288. Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., Sen, M., Iyer, N., Kapoor, N., Balaji, K. N., and Chakravorty, D. (2010) ***Cationic amino acid transporters and Salmonella Typhimurium ArgT collectively regulate arginine availability towards intracellular Salmonella growth***. *PLoS One.* **5**, e15466
289. Tabor, C. W., and Tabor, H. (1985) ***Polyamines in microorganisms***. *Microbiol. Rev.* **49**, 81–99
290. Kwon, D. H., and Lu, C.-D. (2006) ***Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in Pseudomonas aeruginosa PA01***. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1615–22
291. Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., and Tabor, H. (2003) ***Polyamines protect Escherichia coli cells from the toxic effect of oxygen***. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2261–5
292. Sturgill, G., and Rather, P. N. (2004) ***Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in Proteus mirabilis***. *Mol. Microbiol.* **51**, 437–46
293. Wortham, B. W., Oliveira, M. A., Fetherston, J. D., and Perry, R. D. (2010) ***Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for Yersinia pestis biofilm formation***. *Environ. Microbiol.* **12**, 2034–47
294. Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2010) ***Modulation of cellular function by polyamines***. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 39–51
295. Kahane, S., Levitz, R., and Halpern, Y. S. (1978) ***Specificity and regulation of gamma-aminobutyrate transport in Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* **135**, 295–9
296. Baca-DeLancey, R. R., South, M. M. T., Ding, X., and Rather, P. N. (1999) ***Escherichia coli genes regulated by cell-to-cell signaling***. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4610–4614
297. Zaboura, M., and Halpern, Y. S. (1978) ***Regulation of gamma-aminobutyric acid degradation in Escherichia coli by nitrogen metabolism enzymes***. *J. Bacteriol.* **133**, 447–51

298. Soksawatmaekhin, W., Kuraishi, A., Sakata, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2004) ***Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in Escherichia coli.*** *Mol. Microbiol.* **51**, 1401–12
299. Neely, M. N., and Olson, E. R. (1996) ***Kinetics of expression of the Escherichia coli cad operon as a function of pH and lysine.*** *J. Bacteriol.* **178**, 5522–8
300. Kurihara, S., Oda, S., Kato, K., Kim, H. G., Koyanagi, T., Kumagai, H., and Suzuki, H. (2005) ***A novel putrescine utilization pathway involves gamma-glutamylated intermediates of Escherichia coli K-12.*** *J. Biol. Chem.* **280**, 4602–8
301. Higashi, K., Ishigure, H., Demizu, R., Uemura, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2008) ***Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtII) in Escherichia coli.*** *J. Bacteriol.* **190**, 872–8
302. Jelsbak, L., Thomsen, L. E., Wallrodt, I., Jensen, P. R., and Olsen, J. E. (2012) ***Polyamines are required for virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium.*** *PLoS One.* **7**, e36149
303. Harvey, P. C., Watson, M., Hulme, S., Jones, M. a, Lovell, M., Berchieri, A., Young, J., Bumstead, N., and Barrow, P. (2011) ***Salmonella enterica serovar typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes.*** *Infect. Immun.* **79**, 4105–21
304. Taga, M. E., Semmelhack, J. L., and Bassler, B. L. (2008) ***The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in Salmonella typhimurium.*** *Mol. Microbiol.* **42**, 777–793
305. Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., and Bassler, B. L. (2001) ***The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule.*** **41**, 463–476
306. Xavier, K. B., and Bassler, B. L. (2003) ***LuxS quorum sensing: more than just a numbers game.*** *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 191–197
307. Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., and Hughson, F. M. (2004) ***Salmonella typhimurium recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2.*** *Mol. Cell.* **15**, 677–87
308. Surette, M. G., Bassler, B. L., and Tn-n, A. (1999) ***Regulation of autoinducer production in Salmonella typhimurium.*** **31**, 585–595
309. Taga, M. E., Miller, S. T., and Bassler, B. L. (2003) ***Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in Salmonella typhimurium.*** *Mol. Microbiol.* **50**, 1411–1427
310. Xue, T., Zhao, L., Sun, H., Zhou, X., and Sun, B. (2009) ***LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in Escherichia coli AI-2 quorum sensing.*** *Cell Res.* **19**, 1258–68
311. Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996) ***Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators.*** *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 727–51
312. Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1997) ***Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria.*** *Mol. Microbiol.* **24**, 895–904

313. Lazazzera, B. A., and Grossman, A. D. (1998) ***The ins and outs of peptide signaling.*** *Trends Microbiol.* **6**, 288–94
314. Bassler, B. L. (1999) ***How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing.*** *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 582–7
315. De Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. (2000) ***Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships.*** *Infect. Immun.* **68**, 4839–49
316. Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001) ***Quorum sensing in bacteria.*** *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–99
317. Schauder, S., and Bassler, B. L. (2001) ***The languages of bacteria.*** *Genes Dev.* **15**, 1468–80
318. Choi, J., Shin, D., and Ryu, S. (2007) ***Implication of quorum sensing in Salmonella enterica serovar typhimurium virulence: the luxS gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1.*** *Infect. Immun.* **75**, 4885–90
319. Choi, J., Shin, D., Kim, M., Park, J., Lim, S., and Ryu, S. (2012) ***LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of Salmonella typhimurium by regulating SPI-1 and flagella genes.*** *PLoS One.* **7**, e37059
320. Lostroh, C. P., and Lee, C. a (2001) ***The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system.*** *Microbes Infect.* **3**, 1281–91
321. McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., and Koronakis, V. (2009) ***Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host.*** *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 117–24
322. Eichelberg, K., and Galán, J. E. (1999) ***Differential regulation of Salmonella typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA.*** *Infect. Immun.* **67**, 4099–105
323. Ellermeier, J. R., and Slauch, J. M. (2007) ***Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in Salmonella enterica serovar Typhimurium.*** *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 24–9
324. Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A., and Finlay, B. B. (2005) ***Salmonella pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine.*** *PLoS Pathog.* **1**, e32
325. Soni, K. A., Jesudhasan, P. R., Cepeda, M., Williams, B., Hume, M., Russell, W. K., Jayaraman, A., and Pillai, S. D. (2008) ***Autoinducer AI-2 Is Involved in Regulating a Variety of Cellular Processes in Salmonella Typhimurium.*** *Foodborne Pathog. Dis.* **5**, 147–153
326. Amoresano, A., Carpentieri, A., Giangrande, C., Palmese, A., Chiappetta, G., Marino, G., and Pucci, P. (2009) ***Technical advances in proteomics mass spectrometry: identification of post-translational modifications.*** *Clin. Chem. Lab. Med.* **47**, 647–65
327. Silva, A. M. N., Vitorino, R., Domingues, M. R. M., Spickett, C. M., and Domingues, P. (2013) ***Post-translational modifications and mass spectrometry detection.*** *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 925–41
328. Kim, H.-J., Ha, S., Lee, H. Y., and Lee, K.-J. (2014) ***ROSics: Chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology.*** *Mass Spectrom. Rev.* 10.1002/mas.21430

329. Held, J. M., and Gibson, B. W. (2012) ***Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes.*** *Mol. Cell. Proteomics.* **11**, R111.013037
330. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. a, Olsen, J. V, and Mann, M. (2011) ***Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment.*** *J. Proteome Res.* **10**, 1794–805
331. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., and Koonin, E. V (2000) ***The COG database : a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution.*** **28**, 33–36