



UNR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Mecanismos de patogénesis de *Serratia marcescens*”

Lic. Gisela Di Venanzio

Directora: Dra. Eleonora García Véscovi

Rosario, Argentina

2014

“Mecanismos de patogénesis de *Serratia marcescens*”

Gisela Di Venanzio

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Departamento de Microbiología, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los años 2010 y 2013 bajo la dirección de la Dra. Eleonora García Véscovi.

*a los que buscan
aunque no encuentren*

*a los que avanzan
aunque se pierdan*

*a los que viven
aunque se mueran*

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Eleonora García Véscovi, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme la posibilidad de ser parte de su grupo de trabajo, por haber contribuido a mi formación, transmitiéndome sus conocimientos y experiencia científica y por siempre estar dispuesta a la discusión e intercambio de ideas.

A los Dres. Fernando Soncini y Susana Checa por su constante buena predisposición para las discusiones experimentales, sus sugerencias y apoyo.

A las Dras. Eugenia Castelli, Griselda Fedrigo y Julieta Barchiesi, por su constante apoyo en el laboratorio, la paciencia y buena predisposición para enseñarme y explicarme todo lo que pude necesitar. A Gri y Juli por todos los almuerzos compartidos, gracias por hacer del laboratorio un mejor lugar.

A los Dres. María Isabel Colombo, Emanuel Campoy y Milton Agulera por la colaboración y prestamos para la realización de esta tesis.

A los Dres. Ferrandon y Lestradet, al igual que a todos los integrantes del grupo de Estrasburgo, por la buena predisposición y hacer de mi estadía una muy buena experiencia.

A los amigos y buenos compañeros del laboratorio: Mili, Sut, Tati, Vicky, Nadia, Caro, Martu, Gaby, Aldi, Lucas, Seba, Ale, Gastón, Roberto, Nico y Javi. Gracias por todos los mates, charlas y buenos momentos compartidos. Quiero agradecer especialmente a Lola y Rodrigo por su infinita ayuda, porque gran parte de esta tesis no hubiese sido posible sin ellos y por siempre hacer divertido el trabajo, y a Mara por su ayuda en mi corta incursión en la citometría de flujo y por ser mi compañera en la aventura.

Al resto de los buenos amigos del IBR y de la Facultad, por acompañarme en este trayecto y hacerlo siempre divertido. Especialmente a Lore; Caro y Melina por siempre estar.

A mis amigas de siempre, las chicas del pueblo, por siempre mostrar interés y el apoyo constante en estos años.

A mi mamá, papá y hermano por el aliento, la comprensión y apoyo constante.

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

Publicaciones en el periodo:

Barchiesi J, Castelli ME, **Di Venanzio G**, Colombo MI, García Véscovi E. 2012. The PhoP/PhoQ System and Its Role in *Serratia marcescens* Pathogenesis. Journal of Bacteriology, 194(11):2949. DOI: 10.1128/JB.06820-11.

Fedrigo GV*, Campoy E*, **Di Venanzio G***, Colombo MI, García Véscovi E. 2011. *Serratia marcescens* is able to Survive and Proliferate in Autophagic-like Vacuoles inside Non-Phagocytic Cells. PLoS One 6(8): e24054. doi:10.1371/journal.pone.0024054. * estos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

Presentación a reuniones científicas.

Lazzaro, Martina; **Di Venanzio, Gisela**; García Véscovi, Eleonora. 2013. "Caracterización de la regulación y mecanismo de acción de la hemolisina ShIA de *Serratia marcescens*". XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina.

Di Venanzio G, Stepanenko T, García Véscovi E. 2012. Characterization of the *Serratia marcescens* mutant strain in the gene that encodes ShIA cytolysin. 48th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research.

Stepanenko TM, **Di Venanzio GA**, Castelli ME, García Véscovi E. 2011. Characterization of regulatory mechanisms of ShIA hemolysin expression in *Serratia marcescens*. 47th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research.

Di Venanzio G, Fedrigo GV, Campoy E, Colombo MI, García Véscovi E 2010. *Serratia marcescens* modulation of autophagy and the role of ShIA haemolysin. 46th Annual Meeting. Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
IDIOMA EXTRANJERO	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
<i>Serratia marcescens</i>	12
Perspectiva histórica	12
El género <i>Serratia</i>	13
<i>Serratia marcescens</i>	13
Patogénesis de <i>Serratia</i>	14
Factores de virulencia	16
Resistencia antibiótica	16
Quórum sensing	17
Biosurfactantes y motilidades de tipo swimming y swarming	18
Flagelo	19
Exoproteínas	22
Hemolisina	23
Biología celular de patógenos intracelulares	27
Internalización	28
Sistema inmune del hospedador y ciclo intracelular del patógeno	28
Vía endocítica	29
Vía autofágica	30
Subversión de la respuesta inmune y ciclo intracelular de patógenos: modelos de estudio	34
<i>Drosophila melanogaster</i>	37
Modelo de estudio	37
Inmunidad	38
Respuesta epitelial y flora intestinal	38

Componentes de la Inmunidad sistémica	40
Hemocitos	40
Fagocitosis	40
Melanización	40
Coagulación	41
Inducción de AMPs dependiente del cuerpo graso	42
Regulación de la inmunidad sistémica	42
La vía Toll	42
La vía IMD	42
Infección por <i>Serratia marcescens</i>	43
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Líneas celulares, cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	46
Medios de cultivo	48
Anticuerpos y reactivos	49
Purificación de ShIA	49
Preparación de Anticuerpos anti-ShIA	52
Purificación de Anticuerpos anti-ShIA (Stripping)	52
Técnicas moleculares	53
Ácidos nucleicos	53
Extracción de ADN bacteriano genómico	53
Preparación de ADN bacteriano plasmídico	53
Reacción en cadena de la polimerasa	54
Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)	55
Electroforesis de ADN en geles de agaros	55
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	55

Digestión de ADN con enzimas de restricción	56
Reacciones de ligación de fragmentos de ADN	56
Secuenciación de fragmentos de ADN	56
Preparación de células competentes	56
Transformación de células competentes y selección de transformantes	57
Conjugación tripartita	57
Manipulación genética	57
Construcción de la mutante <i>S. marcescens shIB::Sp</i>	57
Construcción del plásmido <i>pshIBA</i>	59
Análisis de proteínas de <i>S. marcescens</i>	59
Precipitación de proteínas secretadas	59
Preparación de fracciones proteicas de <i>S. marcescens</i>	60
Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	60
Tinción de gel con azul de Coomassie	61
Transferencia e inmunodetección (Western blot)	61
Ensayos de hemólisis en medio líquido	61
Curvas de crecimiento bacteriano	62
Técnicas de cultivos celulares	63
Ensayos de invasión o protección a la gentamicina	63
Ensayos de autofagia	63
Transfección de células epiteliales	64
Marcación de compartimentos degradativos durante la infección con <i>S. marcescens</i>	64
Marcación de compartimentos ácidos durante la infección con <i>S. marcescens</i>	64
Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	65
Marcación de bacterias citoplasmáticas e intravacuolares mediante permeabilización diferencial de la célula epitelial	65

Medición de actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)	66
<i>Drosophila melanogaster</i>	66
Cepas de insectos	66
Infección mediante Herida Séptica	67
Infección mediante vía oral	67
Inyección de partículas de látex	67
Capítulo I: Caracterización de los procesos de invasión y replicación de <i>S. marcescens</i> en células epiteliales	68
INTRODUCCIÓN	68
RESULTADOS	69
Mecanismo de Invasión y Replicación de <i>S. marcescens</i> en distintas líneas celulares	69
Caracterización del compartimento intracelular que contiene a <i>S. marcescens</i>	71
Caracterización del proceso autofágico disparado por <i>S. marcescens</i>	76
CONCLUSIONES	81
Capítulo II: Caracterización de la hemolisina ShIA	82
INTRODUCCIÓN	82
RESULTADOS	82
Rol de la hemolisina en la Autofagia	82
ShIA estaría involucrada en procesos tardíos de la invasión	85
Caracterización del proceso de salida de la célula eucariota	88
Caracterización del modelo de invasión de la mutante	93
Localización de la hemolisina ShIA	94
CONCLUSIONES	98
Capítulo III: Caracterización de los procesos de invasión y replicación de <i>S. marcescens</i> en <i>D. melanogaster</i>	99
INTRODUCCIÓN	99
RESULTADOS	99

Validación del modelo de infección oral con <i>S. marcescens</i> salvaje	99
Caracterización de las cepas mutantes de <i>S. marcescens</i> en el modelo de infección mediante herida séptica	100
Efecto de la aireación y temperatura de crecimiento de <i>S. marcescens</i> en un modelo de infección oral de <i>D. melanogaster</i>	103
Caracterización de las cepas mutantes de <i>S. marcescens</i> en el modelo de infección oral	105
CONCLUSIONES	111
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES GENERALES	125
RESUMEN	126
BIBLIOGRAFÍA	128

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores con casete de unión a ATP
Abs ₂₆₀	Absorbancia a 260 nanómetros
Abs ₂₈₀	Absorbancia a 280 nanómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
AHL	N-acil-homoserin lactona
AI-2	Autoinductor 2
Alfa-MEM	Medio de cultivo esencial mínimo alfa
AMPs	Péptidos antimicrobianos
Ap ^R	Resistencia a ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
<i>atg</i>	Genes relacionados a autofagia
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATPasa	Adenosina 5` trifosfato hidrolasa
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CHO	Células de ovario de hámster chino
CHO-LC3-GFP	Celulas CHO que expresan de forma estable la fusion GFP-LC3
Cm ^R	Resistencia a cloramfenicol
Cy3	Molécula fluorescente 3 derivada de la cianina

Da	Daltons
DAP	Ácido diaminopimélico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Unidad de densidad óptica
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
Duox	Oxidasa dual de membrana
ECs	Enterocitos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEA1	Antígeno 1 de endosoma temprano
EGTA	Ácido etilenglicol bis(β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GEF	Factor de intercambio de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
Gm ^R	Resistencia a gentamicina
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfato hidrolasa
h	Horas
HeLa	Células epiteliales de carcinoma humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IMD	Vía de deficiencia inmune

IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ISC	Células madres intestinales
JNK	Quinasa Jun N-terminal
Km ^R	Resistencia a kanamicina
k	Kilo
kV	Kilovoltios
LAMP	Proteína asociada a membrana de lisosomas
LB	Luria Bertani
LC3	Proteína asociada a microtúbulo
LCV	Variante celular grande
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLO	Listeriolisina O
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamperios
MEF	Fibroblastos de tejido embrionario de ratón
MFP	Proteína de fusión a membrana
min	Minutos
MOI	Multiplicidad de infección
NBT	Azul de nitrotetrazolio
ON	Toda la noche
PAS	Sitio de ensamblaje del fagóforo
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PGN	Peptidoglicano
PGRP	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano
p.i	Post-infección
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinasa
PI3P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PFT	Toxina formadora de poros
p/v	Peso/volumen
QS	Quórum sensing
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente
RILP	Proteína lisosomal que interacciona con Rab
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i>
SCV	Variante celular pequeña
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SeCV	Vacuola que contiene a <i>Serratia</i>
SLAPs	Fagosomas espaciosos conteniendo a <i>Listeria</i>
SPE	Enzima que activa a Spz
SPI	Isla de patogenicidad
Sp ^R	Resistencia a espectinomicina
Spz	Spätzle
SST1-7	Sistema de secreción tipo 1-7

SST3f	Sistema de secreción tipo 3 flagelar
T24	Células epiteliales de vejiga humana
TBE	Buffer Tris-Boro-EDTA
TBS	Buffer Tris salin
Tc ^R	Resistente a tetraciclina
TLR	Receptor tipo Toll
TPS	Sistema de dos compañeros
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
V-ATPasa	Adenosina 5´trifosfato hidrolasa V

IDIOMA EXTRANJERO

Buffer: solución reguladora

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 – *Serratia marcescens*

1.1 – Perspectiva histórica

A principios de julio de 1819, en Legnaro, provincia de Padua, Italia, ocurrió un fenómeno que inquietó a muchos de los habitantes del área. Ese verano en particular había sido más húmedo y caluroso de lo habitual, y la polenta se tiñó de rojo. Los habitantes supersticiosos le temían a esta “polenta sangrienta” y pensaban que el origen de este fenómeno era diabólico. La policía formó una comisión de profesores de la Universidad de Padua para asesorar en la investigación. Independientemente de esta comisión, Bartolomeo Bizio, realizó experimentos y en 1819 en una publicación anónima, concluyó que la polenta con tintes rojos era provocada por fenómenos naturales. En su publicación de 1823, Bizio determinó que la causa de la polenta roja era un organismo al cual denominó *Serratia marcescens*, en honor al físico italiano Sefarino Serrati, quien fuera uno de los primeros en trabajar en los barcos de vapor y *marcescens* proviene del latín para “decaer”, ya que el pigmento similar a la sangre se deterioraba rápidamente (Mahlen, 2011; Petersen & Tisa, 2013).

El primero de varios experimentos con *S. marcescens* como organismo indicador o de rastreo, fue realizado por M. H. Gordon en 1906. Se le pidió a Gordon que investigara la higiene atmosférica de la casa de los Comunes en Inglaterra, luego de un brote de gripe que se dio entre los miembros de la casa. Gordon colocó placas de Petri abiertas a su alrededor en la Casa de los Comunes vacía e hizo gárgaras con un cultivo líquido de *S. marcescens* para determinar la dispersión de los organismos mientras recitaba pasajes de Shakespeare. Se encontraron colonias de *S. marcescens* lo suficientemente alejadas de Gordon para demostrar que los microorganismos pueden dispersarse por el habla, además de propagarse mediante la tos y los estornudos (Mahlen, 2011).

A principios de 1970, era cada vez más claro que *S. marcescens* podría ser un patógeno, pero por muchos años, se pensó que éste era un organismo no patogénico y un indicador de rastreo ideal. En noviembre de 1976, el diario *Newsday* de Long Island publicó una nota en la cual describía pruebas que el gobierno de Estados Unidos realizó sobre la población de San Francisco en 1950 y en el sistema de subterráneos de Nueva York para determinar cuán vulnerables eran estas ciudades a ataques por armas biológicas y la viabilidad de los organismos usados en estos

posibles ataques. El reporte mencionaba la muerte de al menos un individuo debido a una infección causada por el mismo organismo utilizado en estas pruebas, *S. marcescens* y que al menos otros 5 pacientes habían presentado distintas infecciones causadas por esta misma bacteria (Mahlen, 2011; Petersen & Tisa, 2013).

1.2 - El género *Serratia*

El género *Serratia* está formado por bacilos Gram negativos de 0,9 – 2 µm de largo y 0,5 – 0,8 µm de diámetro y forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Van Houdt *et al.*, 2007). Miembros del género *Serratia*, particularmente la especie *Serratia marcescens*, causan importantes infecciones en humanos, animales e insectos. Hay 14 especies y 2 subespecies reconocidas en el género, *S. entomophila*, *S. ficara*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens* subsp. *marcescens*, *S. marcescens* subsp. *sakuensis*, *S. nematodiphila*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea*, *S. ureilytica* (Mahlen, 2011).

La mayoría de las especies de *Serratia* son mótils mediante flagelos peritricos, anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo. Son habitantes ubicuos de suelo, agua y plantas y se encuentran normalmente asociadas con alimentos crudos, lo que causa el desperdicio de estos alimentos. Además, son capaces de colonizar una amplia variedad de superficies en el tracto digestivo de roedores, insectos, peces y humanos (Grimont & Grimont, 1978) y plantean un peligro para la salud como patógenos oportunistas. En particular, *Serratia marcescens*, representa un importante patógeno nosocomial capaz de causar neumonía, infecciones intravenosas asociadas a cateterismos, infecciones del tracto urinario, osteomielitis y endocarditis que se ven exacerbadas por la existencia de cepas resistentes a múltiples antibióticos (Eisenstein, 1990).

1.3 - *Serratia marcescens*

S. marcescens era considerado originalmente un organismo de agua saprófito, inocuo, no patogénico y era utilizado como un marcador biológico debido a sus colonias rojas que son fácilmente reconocibles. Luego de la revisión de ciertos incidentes en 1896, el profesor Scheurlen de la Universidad de Estrasburgo concluyó que este organismo contribuía a más muertes que muchas bacterias patogénicas. Desde 1960, la frecuencia del número de reportes de infecciones causadas por este organismo aumentó considerablemente (Hejazi & Falkiner, 1997). La habilidad de

causar infecciones se suponía limitada a pacientes con desórdenes debilitantes, pero actualmente *S. marcescens* se ha implicado como el agente etiológico de cada tipo de infección existente, incluyendo infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis e infecciones de heridas. Se reportó que *S. marcescens* causa endocarditis adquiridas en la comunidad y en los hospitales (Hejazi & Falkiner, 1997). Además, se identificó a *S. marcescens* como el agente causal de la “plaga blanca”, una seria amenaza al coral caribeño, *Acropora palmata* (Mahlen, 2011).

Grimont y Grimont describieron a *S. marcescens* como un bacilo Gram negativo oxidasa negativo que produce ADNasa (Grimont & Grimont, 1978). El potencial de *S. marcescens* de utilizar un amplio rango de nutrientes se ve expresado claramente por su habilidad de sobrevivir y crecer bajo condiciones extremas, incluyendo desinfectantes, antisépticos y agua dos veces destilada (Hejazi & Falkiner, 1997).

Los aislamientos ambientales de *S. marcescens* producen un pigmento rojo característico denominado prodigiosina. La bacteria pigmentada se encuentra en distintos nichos ecológicos que incluyen suelo, agua, aire, plantas y animales. La habilidad de producir prodigiosina es característica de *S. marcescens*, pero se desconoce la función de este pigmento rojo ya que los aislamientos clínicos no suelen ser pigmentados (Hejazi & Falkiner, 1997).

1.4 - Patogénesis de *Serratia*.

Serratia marcescens es un patógeno oportunista de humanos que representa un problema creciente para la salud pública, particularmente para pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Como se mencionó anteriormente, es capaz de causar infecciones en el sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario, neumonía y otras infecciones respiratorias, infecciones del torrente sanguíneo incluyendo endocarditis e infecciones de heridas. Además, *S. marcescens* es un importante patógeno ocular, no necesariamente en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos (Mahlen, 2011) Si bien se han identificado diversos factores de virulencia potenciales producidos por *S. marcescens*, existen muy pocas publicaciones donde se explora en profundidad los mecanismos que utiliza para invadir, sobrevivir y proliferar dentro del hospedador (Fedrigo *et al.*, 2011; Hejazi & Falkiner, 1997; Nehme *et al.*, 2007)

Hertle y Schwartz (Hertle & Schwarz, 2004) reportaron que *S. marcescens* es capaz de invadir distintas líneas celulares epiteliales, por un mecanismo dependiente de la adhesión y de la producción de hemolisina. Propusieron que dicha toxina facilitaría la internalización de la bacteria, pero no estaría involucrada en la replicación intracelular.

En un reporte más reciente se demostró que distintos aislamientos clínicos no pigmentados de *S. marcescens* eran citotóxicos ante distintas líneas celulares epiteliales y de macrófagos, y que esta citotoxicidad era dependiente del contacto entre las bacterias y las células eucariotas. Además, se reportó que *Serratia* era capaz de inducir necrosis y apoptosis dependiente de caspasas en estas líneas celulares (Krzymińska *et al.*, 2012).

S. marcescens es un potente patógeno de *Drosophila melanogaster* en un modelo de herida séptica sin embargo, los insectos no sucumben en un modelo de infección oral con *Serratia* (Flyg *et al.*, 1980; Nehme *et al.*, 2007). Las bacterias inyectadas resisten la respuesta inmune sistémica, proceso que involucra al antígeno O del lipopolisacárido (LPS). Las bacterias ingeridas escapan del tracto digestivo hacia el hemocele, a través del epitelio intestinal y son sensibles a la respuesta local de la vía IMD (del inglés, **imm**une **def**iciency **pathway**) que se dispara en el intestino del insecto infectado. Además, la fagocitosis es un mecanismo de defensa efectivo contra las bacterias ingeridas que escaparon hacia la hemolinfa (Nehme *et al.*, 2007).

Kurz y colaboradores, realizaron una búsqueda de factores de virulencia en *S. marcescens*, demostrando la capacidad de esta enterobacteria para invadir un amplio rango de hospedadores, tales como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster* y cultivos de células epiteliales. Reportaron que los genes implicados en la biosíntesis de lipopolisacárido (LPS), la captación de hierro y la producción de hemolisina son necesarios para la virulencia de *Serratia in vivo* (Kurz *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio, demostramos que *S. marcescens* es capaz de invadir células no fagocíticas por medio de la vía endosomal, y residir y multiplicarse dentro de ellas en grandes compartimentos rodeados de membrana que se denominaron SeCV (del inglés **Serratia containing vacuole**, vacuola que contiene a *Serratia*) (Fedrigo *et al.*, 2011). *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial. El patógeno ingresa a la célula hospedadora contenido en una vacuola con características de endosoma o fagosoma temprano, que rápidamente adquiere

marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3). Además, *Serratia* requiere un estado metabólicamente activo para inducir autofagia y ser capaz de invadir células CHO, pero no requeriría la fosfolipasa PhlA para estos procesos (Fedrigo *et al.*, 2011).

1.5 - Factores de virulencia

S. marcescens es usualmente clasificado como un patógeno oportunista, cuyos factores de virulencia se desconocen. Como se describió en la sección anterior, la bibliografía sobre la patogénesis de esta bacteria es escasa, por lo cual la identidad y los mecanismos de acción de los potenciales factores de virulencia todavía deben ser dilucidados. A continuación se efectúa una síntesis de los conocimientos más relevantes de algunos de estos factores.

1.5.1 - Resistencia antibiótica

Las infecciones causadas por *S. marcescens* suelen ser difíciles de tratar debido a la resistencia de esta enterobacteria a antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas (Maseda *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2003).

El mecanismo más común de resistencia a aminoglicósidos en *S. marcescens* está mediado por enzimas que modifican al antibiótico. Estas enzimas modifican su blanco al agregar grupos acetilos (N-acetiltransferasas), grupos fosfatos (O-fosfotransferasas) o nucleótidos (O-nucleótidotransferasas). De esta manera, el aminoglicósido es incapaz de unirse a su blanco en el ribosoma. La resistencia también puede estar dada debido a mecanismos bacterianos que provocan la alteración del ribosoma mismo, la impermeabilización de la célula o el aumento en la expresión de los canales de eflujo. Muchos brotes nosocomiales en pacientes pediátricos y adultos son causados por cepas de *S. marcescens* resistentes a uno o varios aminoglicósidos (Mahlen, 2011).

Las especies del género *Serratia* son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos β -lactámicos como la penicilina G, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas. Algunas cepas de *S. marcescens* poseen carbapenemasas cromosomales y β -lactamasas codificadas por el gen cromosomal *ampC*, que pueden hidrolizar cefalosporinas y penicilinas. El gen *ampC* de *S. marcescens* es inducible por varios antibióticos β -lactámicos mediante un mecanismo complejo que involucra el reciclado de la pared celular (Mahlen, 2011). La resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. marcescens* viene dada por dos mecanismos: la expresión de β -lactamasas activas

capaces de degradar antibióticos de la familia de las cefalosporinas, carbapenemes y, penicilinas; y por otro lado, una menor permeabilidad de la membrana debido a modificaciones en el antígeno O de su LPS (Hejazi & Falkner, 1997).

En algunas cepas de *S. marcescens* se han encontrado mutaciones específicas en la ADN girasa que reducen la susceptibilidad de esta enzima a las fluoroquinolonas, y se han identificado bombas de eflujo específicas para ciprofloxacina y oxofloxacina, responsables de evitar la acumulación de la fluoroquinolona en el interior de la célula bacteriana (Kumar & Worobec, 2005; Maseda *et al.*, 2011).

Muchas especies del género *Serratia* exhiben resistencia intrínseca a las tetraciclinas. Se ha descrito que, en *S. marcescens*, esta resistencia esta mediada por bombas de eflujo codificadas en el cromosoma o en plásmidos (Mahlen, 2011).

1.5.2 - Quórum sensing

El quórum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación célula a célula que es utilizado por las bacterias para controlar una gran diversidad de funciones celulares como la formación de biofilms y la producción de antibióticos. Cuando la población bacteriana alcanza una masa crítica, las moléculas señales son detectadas y les permiten, a las bacterias, responder a las condiciones ambientales. La mayoría de las bacterias Gram negativas utilizan *N*-acil-homoserin lactonas (AHLs) como moléculas señal. El sistema de QS está compuesto por una AHL sintasa de tipo LuxI y un receptor tipo LuxR (Van Houdt *et al.*, 2007).

En *S. marcescens* hay descritos varios sistemas de QS de tipo LuxIR. En la cepa MG1 el sistema SwI/SwR regula la movilidad tipo swarming, la formación de biofilms, la producción de serrawettinas, proteasas, proteína de la capa S y la fermentación de butanodiol (Eberl *et al.*, 1996a). En la cepa 12 de *S. marcescens* el sistema Smal/SmaR regula la motilidad de tipo swarming, la actividad hemolítica, la formación de biofilms y la producción de quitinasa y caseína (Coulthurst *et al.*, 2006). La motilidad de tipo sliding, independiente de flagelo se encuentra regulada por el sistema de QS SpnI/SpnR en *S. marcescens* SS-1, al igual que la producción de prodigiosina (Mahlen, 2011).

Además de regular la motilidad de tipo swarming, la producción de prodigiosina y la secreción de enzimas mediante Sistema de secreción tipo 1, LipB, el QS es

esencial para el desarrollo normal de biofilms en *S. marcescens* MG1 (Labbate *et al.*, 2004). Los biofilms son estructuras comunitarias formadas por microcolonias de bacterias adheridas a la superficie y embebidas en sustancias exopoliméricas que producen las mismas bacterias (Van Houdt *et al.*, 2007). Labbate y colaboradores propusieron que la formación de biofilm en *S. marcescens* MG1 seguía un programa genético en el cual se observa diferenciación celular y estructural, seguido de la formación de células largas y filamentosas, las cuales agregan y se entrelazan con bacterias vegetativas, permitiendo la maduración del biofilm. La cepa mutante en *swrI*, incapaz de sintetizar C4-HSL y C6-HSL forma biofilms delgados e inmaduros (Labbate *et al.*, 2004). El sistema de QS en *S. marcescens* MG1 juega un rol principal en al menos 4 etapas del desarrollo del biofilm: la unión, la movilidad tipo swarming, la maduración del biofilm y el desprendimiento de las bacterias (von Hoven *et al.*, 2012).

Por otro lado, el QS del tipo LuxS ha sido descrito en bacterias Gram positivas y Gram negativas para las cuales existe una molécula señal universal (no dependiente de especie) denominada Autoinductor-2 (AI-2). LuxS sintetiza AI-2 y, en condiciones de alta densidad celular, el autoinductor se une al sensor LuxP iniciando una cascada de desfosforilación que finaliza con la activación del regulador transcripcional LuxR (Van Houdt *et al.*, 2007). En una cepa pigmentada de *S. marcescens*, se mostró que el sistema LuxS/AI-2 se encuentra involucrado en la producción de prodigiosina y hemolisina. La mutante en *luxS* es menos virulenta en el modelo de infección de *C. elegans*, y muestra una mayor producción de biofilm al comparar con la cepa parental (Coulthurst *et al.*, 2004).

1.5.3 - Biosurfactantes y motilidades de tipo swimming y swarming.

S. marcescens es capaz de desarrollar dos formas de motilidad mediadas por flagelo, swimming y swarming, dependiendo de la viscosidad del medio. El swimming ocurre en medio líquido y es el movimiento individual de la bacteria mediado por flagelo que no involucra procesos de diferenciación celular. En contraste, el swarming ocurre en medio semisólido, es un proceso multicelular y está acompañado por diferenciación celular, reflejándose en la aparición de células bacterianas más largas, multinucleadas, aseptadas e hiperflageladas (Castelli *et al.*, 2008; Eberl *et al.*, 1996b)

Mutantes en *S. marcescens* incapaces de realizar swarming, permitieron identificar a *swrA*, un gen controlado por QS implicado en la síntesis de un exolípido denominado serrawettina W2. Conforme aumenta la densidad celular, la bacteria secreta serrawettina W2, cuyas propiedades biosurfactantes reducen la tensión

superficial del medio y permiten una rápida expansión de la colonia (Lindum *et al.*, 1998).

En *Serratia*, el swarming está regulado por el sistema flagelar, por QS y por sistemas de dos componentes, tal como RssAB. (Van Houdt *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2011). Tanto el swimming como el swarming de *Serratia* se inducen a 30°C, y el swarming, pero no el swimming, se inhibe completamente a 37°C. Soo y colaboradores mostraron que, el mecanismo de control por temperatura de la movilidad de *Serratia* CH-1 se debe en parte a que la producción de serrawetina se induce a 30°C controlada por quórum sensing y, a su vez, a que el sistema RssAB reprime parcialmente la expresión del regulador flagelar FlhDC y la producción de flagelo a 37°C (Soo *et al.*, 2013).

1.5.3.1 - Flagelo

El flagelo es la organela responsable de la locomoción en muchas especies bacterianas. Todos los flagelos bacterianos están formado por tres componentes mayoritarios: el cuerpo basal, que ancla el flagelo en la envoltura celular bacteriana y contiene el motor que impulsa la rotación flagelar; el gancho, que es una varilla curvada y flexible que convierte el movimiento rotacional en olas; y un largo filamento helicoidal, que propaga las olas iniciadas por el gancho y propulsa a la bacteria a través del medio líquido en el que se encuentra. Tanto el filamento como el gancho son estructuras cilíndricas huecas que se extienden desde la superficie celular. El cuerpo basal es la estructura más compleja de las tres mencionadas. En bacterias Gram negativas está formado por cuatro estructuras anulares: el anillo L, asociado al LPS; el anillo P, en la capa de peptidoglicano; el anillo M embebido en la membrana plasmática y el anillo S, directamente anclado en la membrana plasmática. Además, contiene un motor rotatorio y un sistema de secreción tipo III flagelar (SST3f) (Apel & Surette, 2008) (Figura 1).

Los componentes del flagelo bacteriano son capaces de autoensamblarse sin la ayuda de enzimas u otros cofactores. Como se menciona anteriormente, tanto el cuerpo basal como el filamento son estructuras huecas, a través de las cuales se pueden translocar los componentes proteicos del flagelo a sus posiciones correspondientes mediante el SST3f. Durante el ensamblaje, estos componentes proteicos se agregan al extremo distal del flagelo y no en la base. La regulación de la expresión génica flagelar está acoplada al ensamblaje del flagelo (Apel & Surette, 2008).

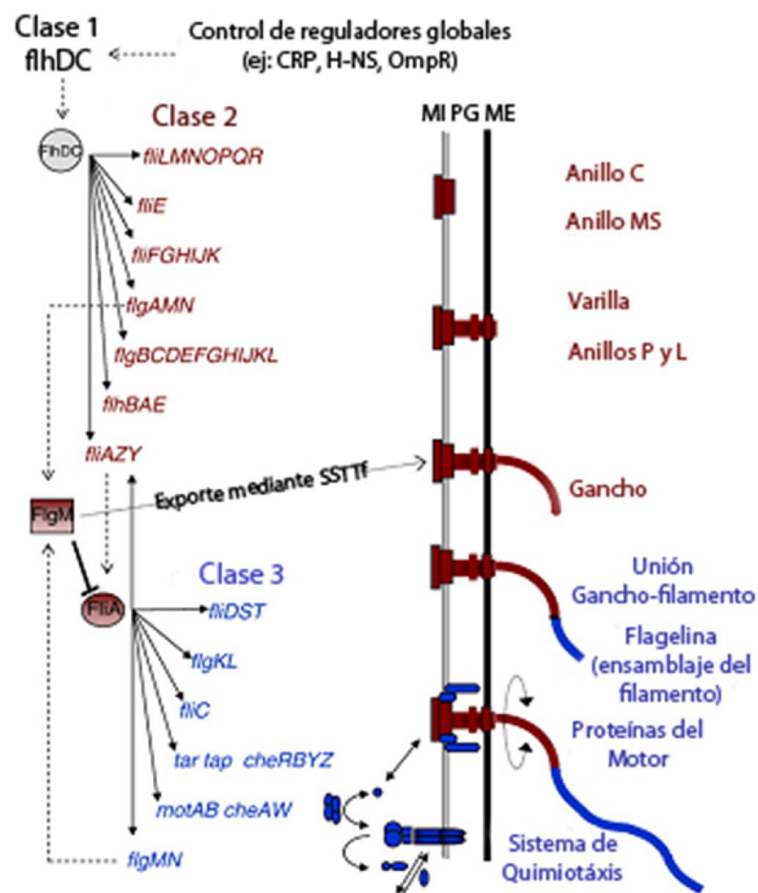


Figura 1. Secuencia temporal de la expresión génica y ensamblaje del aparato flagelar. Los operones del sistema flagelar se expresan en una determinada secuencia temporal, que se observa en esta figura desde arriba hacia abajo. Los operones de clase 2 y 3 se muestran en rojo y azul respectivamente. La membrana interna (MI), el peptidoglicano (PG) y la membrana externa (ME) están indicadas. El factor anti-sigma *FlagM* inhibe el factor sigma de clase 3 *FliA*, hasta el ensamblaje de un SSTTF (sistema de secreción tipo tres flagelar) funcional, por el cual es luego exportado fuera de la célula. *FliA* también regula su propia expresión y contribuye a la expresión de otros operones de clase 2. Adaptado de Apel & Surette, 2008.

El regulón flagelar, tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, está constituido por más de 50 genes agrupados en, al menos, 17 operones. La expresión de estos genes está regulada en múltiples niveles en

respuesta a señales ambientales y señales acopladas al desarrollo morfológico de la organela flagelar. Esta elaborada regulación permite que las proteínas flagelares sean producidas en el momento en que son requeridas para ensamblarse en la estructura flagelar (Macnab, 2003).

Dentro del regulón, los operones están divididos en tres clases de distinta jerarquía transcripcional temporalmente reguladas: clases temprana, media y tardía o clases 1, 2 y 3. El promotor del operón maestro *flhDC* define la clase 1 de promotor flagelar (Figura 1). Es un punto de regulación crucial en el que se decide si se inicia la biosíntesis del flagelo. En este punto convergen numerosas señales globales que determinan si se lleva a cabo la biosíntesis del apéndice. La expresión de *flhDC* está controlada por varios reguladores que responden a estas señales. Dentro de estos reguladores se encuentran las proteínas de shock térmico DnaK, DnaJ y GrpE, que responden a cambios en temperatura; OmpR, que responde a osmolaridad; H-NS, que responde a cambios en pH; cAMP-CRP, que responde a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono y el sistema RcsCDB, que responde, entre otros factores, a estrés de la envoltura celular. Otros factores que afectan la expresión de *flhDC* incluyen transición líquido-superficie, detección de densidad poblacional (QS), control del ciclo celular, fase de crecimiento y síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Anderson *et al.*, 2010b).

Las proteínas FlhD y FlhC codificadas por el operón *flhDC* forman un complejo heterotetramérico, FlhC₂FlhD₂, que actúa como activador transcripcional de los promotores de clase 2 encontrados corriente arriba de los operones de esta clase. Esta activación es dependiente de la ARN polimerasa asociada a la subunidad σ^{70} (Patrick & Kearns, 2012) (Figura 1).

Los productos proteicos de los operones de clase media incluyen proteínas necesarias para la estructura y ensamblaje del cuerpo basal del flagelo, así como también dos reguladores transcripcionales, FliA y su regulador negativo, FlgM. *fliA* codifica para una subunidad σ alternativa de la ARN polimerasa, σ^{28} . El factor σ^{28} , codificado por *fliA*, es el regulador positivo esencial en la cascada flagelar y tiene secuencias de reconocimiento dentro de las regiones promotoras de las tres clases de genes flagelares. En *Serratia*, al igual que en *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Yersinia* y *Proteus*, *fliA* se localiza en el operon *fliAZ*. FlgM censa el estado de desarrollo del flagelo siendo él mismo secretado a través del aparato de secreción tipo III específico del flagelo. Cuando la estructura del cuerpo basal del gancho está completa y es, por lo tanto, competente para secretar las proteínas asociadas al gancho y las

subunidades de flagelina, también se vuelve competente para secretar FlgM. A medida que éste es secretado disminuye su concentración intracelular y se libera la represión sobre la expresión de los transcritos de clase 3, que son activados por σ^{28} (Figura 1) (Anderson *et al.*, 2010b; Patrick & Kearns, 2012).

A excepción de las proteínas asociadas al gancho, todos los genes tardíos son transcritos únicamente a partir de promotores de clase 3. Estos genes codifican para las subunidades generadoras del torque del motor, MotA y MotB, proteínas del sistema de quimiotaxis, y las proteínas que conforman las subunidades de flagelina FliC y FliB, que son polimerizadas fuera de la célula para formar el filamento helicoidal (Macnab, 2003). En *S. marcescens*, trabajos efectuados por nuestro grupo, mostraron que el regulador RcsB es capaz de inhibir la transcripción del regulador maestro FlhDC y, por lo tanto inhibir la biosíntesis del flagelo. La ausencia de ECA (Antígeno común de enterobacterias) cíclico sería la señal que activa a RcsB (Castelli & Véscovi, 2011).

1.5.4 - Exoproteínas

El operón *lipBCD* es responsable de la secreción de varias proteínas no relacionadas, la lipasa LipA, la metaloproteasa PrtA y la proteína de capa de superficie o capa-S, SIA. El sistema de secreción de la proteína LipB es un aparato de secreción de tipo I que pertenece a la superfamilia de transportadores ABC (del inglés **A**TP-**b**inding **c**assette) y está constituido por LipB, la proteína ABC (ATPasa de membrana), LipC, la proteína de fusión de membrana MFP (del inglés **m**embrane **f**usión **p**rotein) y LipD, el polipéptido de membrana externa. La transcripción de los genes *lip* está regulada por el sistema de QS SwI/SwR (Van Houdt *et al.*, 2007).

LipA es una lipasa extracelular, de 62 kDa, clasificada como perteneciente a la subfamilia I-3 (Arpigny & Jaeger, 1999). Las lipasas de esta subfamilia se caracterizan por presentar alto peso molecular, sitio activo característico de las serina esterases, actividad dependiente de Ca^{+2} , exporte mediado por sistemas de secreción tipo I y ausencia de péptido señal N-terminal para su transporte (Angkawidjaja & Kanaya, 2006).

S. marcescens es capaz de secretar hasta cuatro proteasas, pero la metaloproteasa PrtA o serralisina de 56 kDa, posee la mayor actividad entre estas cuatro variantes. La actividad proteolítica se observa a tiempos tardíos de crecimiento y en presencia de sustratos adecuados. La actividad proteasa ha sido repetidamente involucrada en la virulencia de varias cepas provenientes de aislamientos clínicos. La

proteasa PrtA ha sido implicada en la producción de úlceras de la córnea, permeabilidad vascular y la destrucción de componentes del complemento. Es capaz de inducir la respuesta inflamatoria mediante la activación del receptor 2 activado por proteasa (PAR2) en células de carcinoma humano de pulmón EBC-1 y destruir fibroblastos y células HeLa (Petersen & Tisa, 2013).

Mediante la expresión del operón *phlAB*, *S. marcescens* produce una fosfolipasa A denominada PhIA y una proteína accesoria, PhIB, que previene la actividad de PhIA dentro de la bacteria (Givskov & Molin, 1992). Se demostró que PhIA es coexpresada con los genes flagelares, y requiere del flagelo para su exporte (Castelli *et al.*, 2008; Givskov *et al.*, 1995). Si bien no se ha dilucidado el rol patogénico de esta fosfolipasa, recientemente, se ha reportado que PhIA presenta actividad hemolítica frente a glóbulos rojos y actividad citotóxica sobre células epiteliales. En este trabajo se postula que, la liberación de lisofosfolípidos, provenientes de la hidrólisis de fosfolípidos originada por PhIA, serían los responsables de desestabilizar las membranas y originar la actividad hemolítica y citotóxica (Shimuta *et al.*, 2009). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el modelo de invasión de células CHO la expresión de PhIA no es requerida ni para la invasión y replicación en estas células ni para el disparo de autofagia (Fedrigo *et al.*, 2011).

1.5.4.1 - Hemolisina

La actividad hemolítica de *S. marcescens* se ha caracterizado como la principal causa de la citotoxicidad contra un diverso número de líneas celulares de mamíferos, incluyendo células epiteliales y fibroblastos, y es un factor de virulencia importante tanto en vertebrados como invertebrados. La hemólisis también media la liberación de moléculas inflamatorias como histaminas y leucotrienos, que contribuyen a la permeabilidad vascular, a la formación de edemas y la acumulación de granulocitos (Petersen & Tisa, 2013).

La hemolisina fue el primer miembro caracterizado de un nuevo grupo de proteínas secretadas por el sistema de dos compañeros o tipo Vb (Figura 2) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013). La actividad hemolítica está determinada por dos proteínas: ShIA y ShIB. *shIA* codifica para la hemolisina, proteína de 165 kDa y *shIB* codifica para la proteína (65 kDa) de membrana externa responsable de la activación y traslocación de ShIA (Petersen & Tisa, 2013). Se ha reportado que la activación de ShIA también depende de fosfoetanolamina, un componente principal de la membrana externa de *S. marcescens* (Hertle *et al.*, 1997). El sistema de secreción de dos compañeros TPS (del

inglés **two partner secretion**) pertenece a una superfamilia de transportadores de bacterias Gram negativas, mitocondrias y cloroplastos. (Pramanik *et al.*, 2013). Los sistemas de dos compañeros exportan exoproteínas grandes (TpsA) a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas utilizando una proteína de tipo barril β que forma el canal de paso (TpsB). Las proteínas TpsA y TpsB son sintetizadas con una secuencia señal N-terminal y son traslocadas a través de la membrana plasmática por el sistema de secreción Sec. La proteína TpsB luego se inserta en la membrana externa donde forma un barril β con actividad canal que media la secreción de la proteína TpsA (Figura 2) (Mazar & Cotter, 2007).

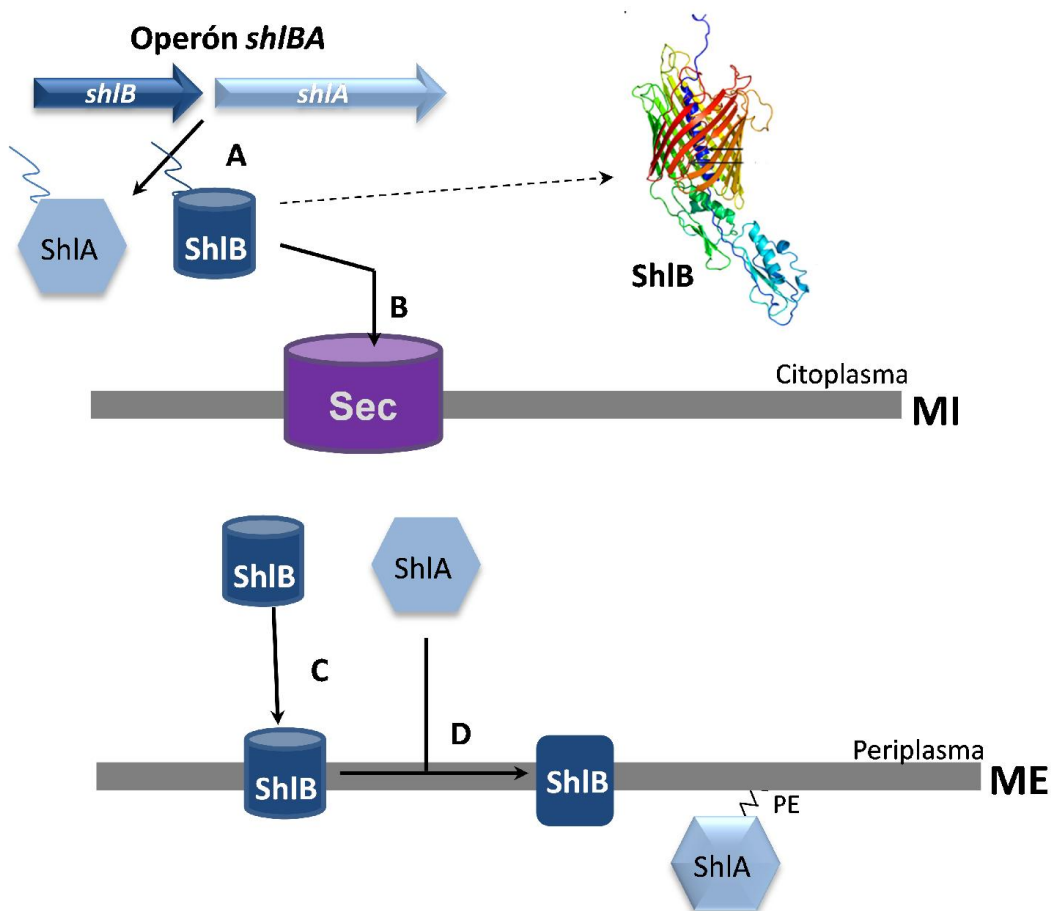


Figura 2. Modelo de secreción de ShIA. La hemolisina es codificada por el operón *shIBA* (A). *shIA* codifica para la hemolisina y *shIB* para la proteína transportadora de membrana externa. Ambas proteínas son sintetizadas como precursores que contienen péptidos señales, los cuales son eliminados durante el transporte de los polipéptidos a través de la membrana plasmática mediante el sistema Sec (B). Luego, la hemolisina es transportada al medio extracelular mediante el sistema de dos compañeros (C), ShIB se inserta en la membrana externa y media el transporte de ShIA a través de la membrana externa (D), alternando entre una conformación «abierta» y «cerrada». Además, ShIB es necesario para la activación de ShIA, provocando un cambio conformacional en la hemolisina y la unión no covalente a fosfatidiletanolamina. La flecha de puntos muestra la estructura terciaria de ShIB. MI: membrana interna, ME: membrana externa, PE: Fosfatidiletanolamina. Adaptado de Hertle, 2000.

La hemolisina de *S. marcescens* representa un nuevo tipo de hemolisina. No posee homología con la secuencia o la estructura de las hemolisinas similares a las de *E. coli* (toxina RTX). Las hemolisinas homólogas a la de *S. marcescens* son las pertenecientes a *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Haemophilus ducreyi*, *Edwardsiella tarda* y *Erwinia chrysanthemi* (Hertle, 2000)

La actividad hemolítica óptima se observa a 30 °C, reduciéndose hasta 10 veces a 37 °C. La reducción de la actividad hemolítica a 37 °C estaría sugiriendo que la hemolisina no sería un factor de virulencia importante en hospedadores de sangre caliente. Sin embargo, la eliminación de *shIBA* anula la virulencia en un modelo de ratón y la citotoxicidad contra múltiples líneas celulares de mamíferos. Entonces, a pesar que se expresa a bajos niveles a 37 °C, la hemolisina todavía podría ser un potencial factor de virulencia a esta temperatura. Lin y colaboradores (Lin *et al.*, 2010) mostraron que en *S. marcescens* CH-1, este efecto de la temperatura se debe, al menos parcialmente, a la vía RssAB-FlhDC-ShIBA. La expresión de *ShIBA* es regulada de manera positiva por el regulador maestro *flhDC*. A su vez, *flhDC* es regulada negativamente por RssAB, un sistema de dos componentes que muestra una mayor expresión a altas temperaturas.

El hierro controla la actividad hemolítica de *S. marcescens* a través de un promotor de tipo Fur en el operón *ShIBA*. Létoffé y colaboradores conjeturan que cuando los niveles ambientales de hierro son bajos, como en el caso del cuerpo humano donde el hierro es secuestrado por los glóbulos rojos para formar el grupo hemo, las bacterias aumentan la expresión de *shIA*. La lisis de los glóbulos rojos mediante *ShIA* liberaría hemoglobina, que sería absorbida por la bacteria mediante la proteína extracelular HasA (Létoffé *et al.*, 1994). Sin embargo, no hay indicios experimentales que indiquen que la hemólisis de glóbulos rojos tenga lugar durante la infección de *Serratia* en humanos.

Marre y colaboradores (Marre *et al.*, 1989) mostraron que la hemolisina de *S. marcescens* contribuye a la colonización del epitelio del tracto urinario en un modelo experimental de rata. Una cepa de *E. coli* 536/21 que produce *ShIA* es 5 veces más eficiente en la colonización que la cepa negativa para *ShIA*. Sin embargo, no está claro si *ShIA* actúa como una adhesina o facilita la colonización por su actividad citolítica. En células epiteliales en cultivo (HEp-2, HeLa) cepas de *S. marcescens* que producen *ShIA* se adhieren a través de fimbrias tipo I. Una cepa de *E. coli* BL21 transformada con los genes *shIBA*, produce 30 veces más hemolisina que *Serratia* salvaje, pero no

es adherente. Por lo tanto, es claro que la adherencia no es principalmente mediada por la hemolisina (Hertle, 2000; Marre *et al.*, 1989).

Kurz y colaboradores identificaron a la hemolisina de *Serratia marcescens* como un factor de virulencia necesario para la invasión en *C. elegans*, *D. melanogaster* y ratones. Además, en este mismo trabajo se demostró que una cepa mutante en ShIA presentaba menor citotoxicidad en distintas líneas celulares (Kurz *et al.*, 2003).

S. marcescens es capaz de invadir distintas líneas celulares (Fedrigo *et al.*, 2011; Hertle, 2000). En estos ensayos, la citotoxicidad, mediada por ShIA, de ciertas cepas de *Serratia* reduce la cantidad de bacterias protegidas de gentamicina ya que las bacterias lisan a las células hospedadoras y las expone a la acción de éste antibiótico agregado al medio de incubación. Cepas isogénicas de *S. marcescens* W225 y W1128 mutantes en hemolisina mostraron una menor capacidad de invasión que las cepas salvajes y mostraron menos citotoxicidad en un ensayo de liberación de Lactato deshidrogenasa, LDH (Hertle, 2000).

S. marcescens posee la capacidad de dañar tejidos, lo que depende de la acción de ShIA. *Edwardsiella tarda* sintetiza una hemolisina homóloga a ShIA. La producción de hemolisina por *E. tarda* aumenta la invasión de células Hep-2 significativamente. En el caso de *Proteus mirabilis*, que también posee una hemolisina homóloga a ShIA, las fimbrias y la motilidad de tipo swarming parecen ser más importantes en la invasión de la célula hospedadora que la producción de hemolisina. *S. marcescens* es capaz de adherirse a distintas células epiteliales a través de fimbrias de tipo 1, las cuales también contribuyen a la producción de superóxido y a la fagocitosis (Hertle, 2000).

Hertle y colaboradores demostraron que la hemolisina ShIA es capaz de inducir la vacuolización de diferentes líneas de células epiteliales y que las vacuolas se distribuyen en todo el citoplasma. Antes de la vacuolización, ShIA induce depleción de ATP y eflujo de potasio en células epiteliales y fibroblastos. La liberación de potasio a través de los poros formados por ShIA en la membrana plasmática, es una señal para que la ATPasa Na^+/K^+ transporte potasio hacia la célula, pero la liberación a través de los poros de ShIA es mayor que la importación. En un intento de restaurar los niveles intracelulares de potasio se consumen las reservas de ATP intracelular (Hertle, 2000; Hertle *et al.*, 1999).

Trabajos más recientes, revisados por von Hoven y colaboradores, muestran que diversas toxinas formadoras de poros o PFTs (del inglés pore forming toxins), como la α -toxina de *Staphylococcus aureus*, la citolisina de *Vibrio cholerae*, la streptolisina O, la Listeriolisina O (LLO) de *Listeria monocytogenes*, la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* y la haemolisina de *E. coli* son capaces de dañar la membrana plasmática de la célula eucariota. Este daño provoca una disminución en los niveles de ATP celular, un aumento en el eflujo de K^+ y como consecuencia el hambreado celular. Estas señales llevan a la activación de la quinasas de eIF2 α sensible al nivel de aminoácidos en la célula (GCN2) y del sensor de energía AMPK; y a la inactivación de mTOR1. La activación/inhibición de estas vías de señalización celular permiten una reprogramación metabólica, la cual induce el proceso autofágico y contribuye a la inducción de un estado quiescente de la célula dañada que favorece la recuperación de la homeostasis y la reparación de la membrana dañada (von Hoven *et al.*, 2012).

A lo largo de esta sección, se ha descrito la capacidad de *S. marcescens* de llevar a cabo diferentes procesos para adaptarse a diversas condiciones medioambientales. Si bien algunas de estas estrategias son, en parte, reguladas por procesos dependientes de QS, los mecanismos regulatorios que este patógeno oportunista articula para adaptarse a diferentes medios y alternar entre ambientes libres y asociados al hospedador son muy complejos y aún desconocidos.

2 - Biología celular de patógenos intracelulares

Las bacterias patógenas han evolucionado como un grupo de microorganismos dotados de herramientas específicas, capaces de perturbar diversos procesos biológicos en células eucariotas a fin de lograr su propio beneficio. Sin embargo, luego de ser captados por la célula hospedadora en un compartimento unido a membrana, los patógenos bacterianos se enfrentan a los desafíos impuestos por la respuesta de defensa innata intracelular. Uno de los mecanismos de eliminación más importantes depende de la vía endocítica. Además, la vía autofágica también es capaz de eliminar a las bacterias patogénicas al mediar la fusión entre los lisosomas y las vacuolas que contienen a los patógenos, en un proceso denominado xenofagia. Entonces, el éxito de estas bacterias reside en las estrategias que utilizan para manipular estos procesos y en el ciclo de vida que realizan intracelularmente. Por ello, en los apartados siguientes de la presente tesis, se describirán los mecanismos de inmunidad innata intracelular y algunas de las estrategias que han desarrollado diferentes bacterias patógenas para subvertir los mecanismos de defensa del hospedador.

2.1 - Internalización

La fagocitosis en mamíferos es dirigida, principalmente, por fagocitos profesionales, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que participan en la eliminación de grandes partículas como son los microorganismos. La internalización y subsecuente destrucción del patógeno son claves para inducir la respuesta inmune innata y promover la presentación de antígenos y el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Flannagan *et al.*, 2009). La interacción de la bacteria con el fagocito puede ser directa, a través del reconocimiento de moléculas asociadas al patógeno (carbohidratos, péptidoglicanos y lipoproteínas) por parte de receptores celulares; o indirecta, mediante las opsoninas (IgG) que se adhieren a la superficie del patógeno y adquieren una conformación que es reconocida por receptores del fagocito (Flannagan *et al.*, 2009). Si bien la respuesta de la célula especializada depende de los receptores reconocidos en la interacción célula-patógeno, la remodelación de actina para la formación de extensiones pseudópodos es un mecanismo común. Este proceso es altamente regulado e involucra receptores específicos de superficie y transducción de señales mediada por GTPasas y fosfoinositoles, responsables de activar proteínas involucradas en la polimerización de actina y proteínas de la familia SNARE implicadas en la fusión de membranas (Mayinger, 2012).

En contraposición, las células no fagocíticas tales como epiteliales o endoteliales normalmente no endocitan microorganismos o partículas grandes y conforman barreras naturales en defensa del hospedador. Estas células son invadidas por patógenos intracelulares, principalmente, a través de dos mecanismos: invasión tipo cierre o mediada por receptor, donde el microorganismo se une fuertemente a la célula y un progresivo movimiento de la membrana plasmática completa la internalización la bacteria; e invasión tipo gatillo, que implica drásticos rearrreglos del citoesqueleto que conducen a la formación de extensiones de la membrana plasmática, las cuales encierran al patógeno en el interior celular (Alix *et al.*, 2011; Alonso & García-del Portillo, 2004).

2.2 - Sistema inmune del hospedador y ciclo intracelular del patógeno

Luego de que la bacteria ha ingresado a la célula eucariota, se encuentra generalmente encerrada en una vesícula membranosa y transita a través del sistema vacuolar celular. Durante este tráfico intracelular, el microorganismo está expuesto a los mecanismos de defensa y degradación del hospedador. En este sentido, las bacterias patógenas despliegan estrategias específicas capaces de evadir estos

mecanismos y de encontrar en el interior celular un nicho adecuado para su supervivencia y replicación.

2.2.1 - Vía endocítica

La vía endocítica constituye la ruta de ingreso de solutos, lípidos y proteínas a la célula y tiene un rol central en la interacción con los microorganismos. Esta vía está compuesta por diferentes organelas, conocidas como endosomas o fagosomas, que se comunican de manera unidireccional desde el endosoma/fagosoma temprano al endosoma/fagosoma tardío y finalmente al lisosoma/fagolisosoma. Cada endosoma presenta una función característica y la maduración de los mismos es un proceso dinámico. La presencia de determinadas GTPasas y fosfoinositoles en las membranas de estas organelas permite atribuirle identidad de temprana, tardía o lisosomal (Segev, 2011).

Las células eucariotas son capaces de detectar la presencia de microorganismos mediante los receptores del tipo TLR (del inglés Toll-like receptor) presentes en la membrana citoplasmática. Estos receptores son activados por moléculas microbianas, tales como LPS, flagelina o lipopolipéptidos, e inducen respuesta inflamatoria contribuyendo a la respuesta inmune innata del hospedador (Franchi *et al.*, 2012).

Luego del ingreso de la bacteria, el fagosoma temprano presenta un lumen medianamente ácido (pH 6,1 - 6,5) y escasa actividad hidrolítica. En la membrana de estas vesículas se encuentra la GTPasa Rab5, implicada en la dirección, anclaje y fusión de fagosomas tempranos. Rab5 actúa utilizando múltiples efectores. La quinasa p150 recluta a la fosfatidilinositol 3-quinasa hVPS34 (PI3K hVPS34) y genera fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en las membranas de estos fagosomas. PI3P ancla a EEA1 (del inglés **E**arly endosome antigen **1**) a la cara citosólica del fagosoma, la cual es efectora de Rab5. Adicionalmente, EEA1 interactúa con una proteína de la familia SNARE denominada syntaxina13 requerida para la fusión de membranas y con otras proteínas esenciales para el desensamble y reutilización de los complejos SNARE. Finalmente, los fagosomas tempranos reciclan moléculas a la membrana plasmática de la célula mediante un proceso que involucra al complejo proteico COP1, y pequeñas GTPasas Arf y Rab (Flannagan *et al.*, 2009; Hughson & Reinisch, 2010).

Una vez que las proteínas de reciclado han sido removidas de las membranas, el fagosoma progresa a la etapa tardía. Este fagosoma tardío se caracteriza por

reclutar la bomba de protones V-ATPasa y, en consecuencia, poseer un lumen más ácido (pH 5,5 – 6). Además, esta organela se enriquece en proteasas y proteínas de membrana asociadas a lisosomas LAMPs (del inglés **L**ysosomal-**a**ssociated **m**embrane **p**roteins), las cuales son importadas desde el complejo de Golgi o adquiridas por fusión con otros endosomas tardíos (Hilbi & Haas, 2012; Hughson & Reinisch, 2010).

La GTPasa Rab7 es un marcador característico de fagosomas tardíos y media el tráfico entre los fagosomas tempranos y los tardíos o lisosomas. Rab7 también recluta varios efectores a la membrana vacuolar, siendo uno de ellos la proteína RILP (del inglés **R**ab-interacting **l**ysosomal **p**rotein) que promueve el movimiento centrípeto de los fagosomas por unir sus membranas a los complejos motores de la célula (Flannagan *et al.*, 2009). El proceso de maduración de esta vía culmina con la fusión de los fagosomas tardíos con los lisosomas para dar origen a los fagolisosomas. En este proceso las membranas reclutan más moléculas de V-ATPasa, con lo cual se acidifica el pH del lumen (pH aproximado de 4,5). Asimismo, los fagolisosomas adquieren enzimas hidrolíticas tales como catepsina e hidrolasas (Hughson & Reinisch, 2010).

La actividad microbicida de los fagolisosomas, se debe a la activación de enzimas hidrolíticas a pH ácido, a la generación de especies reactivas de oxígeno, a la actividad de péptidos antimicrobianos y a la privación de nutrientes que sufre la bacteria fagocitada en este compartimento (Flannagan *et al.*, 2009).

2.2.2 - Vía autofágica

La autofagia es un proceso que se puede considerar como incluido dentro de los mecanismos que preservan la homeostasis celular que consiste en el reciclaje altamente regulado de componentes celulares, como proteínas de vida media prolongada y organelas dañadas, que ocurre durante el desarrollo y la respuesta al estrés. Las tres clases principales de autofagia descrita en mamíferos son microautofagia, que involucra la absorción de citoplasma en la superficie del lisosoma a través de la protrusión, invaginación o deformación de la membrana lisosomal; (macro)autofagia, es la degradación lisosomal de proteínas citoplasmáticas, y organelas, como mitocondrias, retículo endoplasmático (RE) fracturado y peroxisomas en una vesícula doble membrana que se fusiona con el lisosoma; y autofagia mediada por chaperonas, involucra la formación de un complejo entre una proteína citosólica y una proteína chaperona que interactúa con un receptor en la membrana lisosomal

para la siguiente translocación al lisosoma (Kelekar, 2005). En esta sección de la presente tesis se describirán los procesos regulatorios y de formación de las estructuras pertenecientes a la (macro)autofagia.

En la vía autofágica una porción de citoplasma (usualmente entre 0,5 y 1 μm de diámetro) es absorbida por una membrana de aislamiento o fagoforo, que resulta en la formación de una estructura doble membrana denominada autofagosoma. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autolisosoma, que conlleva a la degradación del contenido autofagosomal por las enzimas lisosomales (Figura 3). Los autofagosomas también se pueden fusionar con endosomas, cuerpos multivesiculares y compartimentos de carga del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Levine *et al.*, 2011). Este sistema de degradación lisosomal, tiene como rol principal mantener a las células libres de componentes innecesarios o potencialmente tóxicos, entre los que se cuentan los patógenos. Bajo condiciones limitantes de nutrientes, los niveles de autofagia aumentan con el fin de mantener el reservorio de aminoácidos celular, el cual será usado en procesos anabólicos esenciales. Asimismo, está reportado que este mecanismo está involucrado en procesos de desarrollo y envejecimiento celular, cáncer, neurodegeneración y miopatías (Xie & Klionsky, 2007).

La formación de los autofagosomas comienza en los sitios de ensamblaje de fagoforos, PAS (del inglés **p**hagophore **a**ssembly **s**ites). En las células de mamíferos, existen múltiples PAS al mismo momento. La formación de fagoforos requiere la PI3K de clase III, Vps34, que actúa en un gran complejo macromolecular junto a Beclina 1, Atg14 y Vps15 (también conocida como p150) para formar PI3P. La actividad de este complejo depende de reguladores de la autofagia que actúan corriente arriba (Rubinsztein *et al.*, 2012). La autofagia es inducida por el hambre de nutrientes a través de la inhibición del blanco de rapamicina (mTOR), lo que resulta en la translocación del complejo sustrato de mTOR (ULK1/2, Atg13, FIP200 y Atg101) desde el citosol a ciertos dominios del RE o estructuras cercanas.

La elongación de las membranas que luego evolucionan a autofagosomas, se encuentra regulada por dos reacciones similares a la ubiquitinación (Figura 2). Primero, la molécula tipo ubiquitina Atg12 se conjuga a Atg5 mediante Atg7, que actúa como una enzima activadora de ubiquitina E1 y por Atg10, que es similar a una enzima E2 que conjuga ubiquitina. El complejo Atg5-Atg12 luego interactúa de manera no covalente con Atg16L1 y este complejo resultante se asocia con el fagoforo pero se disocia del autofagosoma (Rubinsztein *et al.*, 2012).

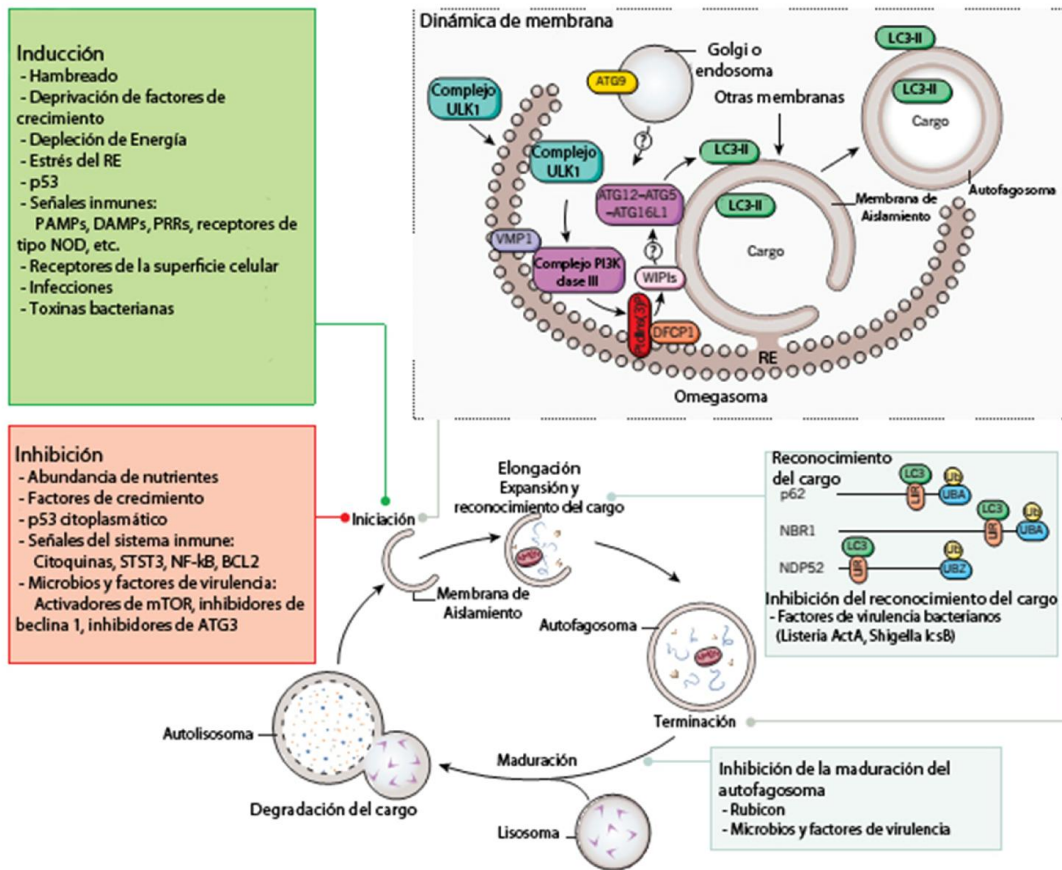


Figura 3. Resumen esquemático de la autofagia y su regulación. El cuadro de arriba a la derecha muestra un modelo de los eventos moleculares involucrados en la iniciación y elongación de membrana y la terminación del autofagosoma. Se piensa que la fuente principal de membranas es el RE, aunque varias otras fuentes de membranas, como mitocondria y la membrana plasmática y nuclear pueden contribuir. Luego de la inducción de la autofagia, el complejo ULK1 (ULK1-ATG13-FIP200-ATG101) (corriente abajo del complejo inhibitorio de señalización mTOR) se transloca al RE y se asocia con VMP1, resultado en la activación del complejo PI3K localizado en el RE, y el PI3P formado en la membrana del RE recluta a DFCP1 y WIPIs. WIPIs y el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 están presentes en la membrana externa y LC3-II está presente en la membrana interna y externa de la membrana de aislamiento, que puede emerger de subdominios del RE denominado omevasoma. Los eventos celulares que ocurren durante la autofagia se describen en el diagrama inferior, incluyendo las principales proteínas conocidas que regulan la iniciación de la autofagia, el reconocimiento del cargo y la maduración del autofagosoma. DAMP, patrón molecular asociado al daño; LIR, región o motivo de interacción con LC3; PAMP, patrón molecular asociado a patógenos; PRR, receptor de reconocimiento de patógenos; Ub, ubiquitina; UBA, dominio asociado a ubiquitina; UBZ, dedos de zinc de unión a ubiquitina. Adaptado de Levine, Mizushima, & Virgin, 2011.

La segunda reacción similar a la ubiquitinación involucra la conjugación de las proteínas de la familia Atg8, formada por las tres subfamilias LC3, GABARAP y GATE-16, al lípido fosfatidiletanolamina (Figura 3). La proteína de cadena liviana 3 asociada a microtúbulos (MAP-LC3/Atg8/LC3), el miembro mejor caracterizado de la familia Atg8, se conjuga a fosfatidiletanolamina mediante Atg7 (similar a E1) y Atg3 (similar a E2), para formar la proteína LC3-II asociada a autofagosomas. Antes de la conjugación, Atg8 es procesada en el extremo C-terminal por la proteasa Atg4 (Randow & Münz, 2012). El complejo Atg5-Atg12 puede aumentar la conjugación de LC3 a fosfatidiletanolamina al actuar de una manera similar a E3. De esta manera, el

complejo Atg5-Atg12-Atg16L puede determinar los sitios de síntesis de autofagosomas al regular la inserción de LC3 a las membranas asociadas a Atg5-Atg12 (Rubinsztein *et al.*, 2012). A su vez, LC3 lipidado facilita el anclaje y la fusión de membranas vesiculares y por lo tanto, puede promover la elongación del fagoforo. Además Atg8/LC3 está involucrado en el anclaje de sustratos al autofagosoma naciente. Una vez que el autofagosoma se completa, se fusiona con lisosomas de forma dependiente de Rab7. Esta fusión es facilitada por un complejo PI3K/Atg6/Beclina1, posiblemente en conjunción con UVRAG y regulado negativamente por Rubicon (Randow & Münz, 2012).

A pesar que el complejo Atg5-Atg12-Atg16L1 localiza en los fagoforos y pre-fagoforos y se disocia del autofagosoma completamente formado, LC3-II permanece asociado con los autofagosomas hasta después de la fusión con lisosomas. La proteína LC3-II dentro de los autolisosomas es degradada, mientras que LC3-II en la superficie citoplasmática puede ser reciclado. Por lo tanto, vesículas positivas para Atg5-Atg12-Atg16L1 y negativas para LC3 representan estructuras pre-autofagosomales (pre-fagoforos y posiblemente fagoforos tempranos), estructuras positivas para ambos marcadores se consideran fagoforos y vesículas Atg5-Atg12-Atg16L1 negativas y LC3 positivas se consideran autofagosomas completos (Rubinsztein *et al.*, 2012).

Además del RE, otras membranas podrían estar involucradas en la formación de los autofagosomas. Atg9, una proteína transmembrana, es esencial para la autofagia y trafica entre la red del *trans*-Golgi, endosomas y precursores de autofagosomas. La mitocondria, la membrana plasmática y la membrana nuclear también pueden ser fuentes de membrana para la formación del autofagosoma (Levine *et al.*, 2011).

Los precursores pre-fagoforos sufren fusión homotípica mediada por SNARE, un proceso importante en la formación del fagosoma y el flujo de la vía autofágica, ya que esta fusión homotípica permite obtener vesículas más grandes. Para que el fagoforo pueda cerrar sus extremos y formar un autofagosoma las membranas requieren elongación y fusión. En levaduras, Atg8 lipidado es esencial para la elongación de membranas autofágicas. Este rol de Atg8, se comprobó en un sistema *in vitro* de liposomas, donde se demostró que promueve la fusión de membranas. En mamíferos, LC3 y la subfamilia GABARAP/GATE-16 son esenciales para la autofagia y actúan en diferentes etapas de la formación del autofagosoma: miembros de la subfamilia LC3 son responsables de la elongación de la membrana autofágica

mientras que los miembros de la familia GABARAP/GATE-16 actúan en la disociación del complejo Atg5-Atg12-Atg16L1. Ambas subfamilias de proteínas asisten con la fusión de membranas luego de la conjugación con fosfatidiletanolamina (Rubinsztein *et al.*, 2012).

2.2.3 - Subversión de la respuesta inmune y ciclo intracelular de patógenos: modelos de estudio

Los patógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus, han desarrollado múltiples estrategias para contrarrestar o evadir las defensas del hospedador y encontrar en el interior celular un nicho adecuado donde sobrevivir y replicarse. Estas estrategias son específicas de cada patógeno, pero básicamente se fundamentan en arrestar o reprogramar la maduración del fagosoma o autofagosoma, escapar al citoplasma evitando la vía endocítica o autofágica, o resistir las condiciones microbicidas del fagolisosoma o autolisosoma. A continuación se describirán modelos de invasión de diferentes patógenos que ejemplifican estos mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedador.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo, capaz de colonizar y multiplicarse en macrófagos. La fagocitosis de este patógeno ocurre a través del reconocimiento por varios receptores celulares, y una vez que la bacteria está contenida dentro del fagosoma la progresión del mismo es arrestada en sus etapas tempranas. Los fagosomas conteniendo a *M. tuberculosis* se caracterizan por la presencia de Rab5, pero el posterior reclutamiento de los efectores EEA1 y PIP3K hVPS34 es inhibido. Sin embargo, durante el proceso de invasión de *M. tuberculosis*, el macrófago es activado y los fagosomas que contienen a la micobacteria son capturados por autofagosomas que se fusionan a lisosomas y terminan eliminando al patógeno. De este modo, si bien *M. tuberculosis* tiene la habilidad de arrestar la maduración de fagosomas subvirtiéndola vía endocítica, no es capaz de resistir los procesos autofágicos y sucumbe ante la defensa del hospedador (Deretic *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva. Este patógeno es intracelular facultativo y es capaz de infectar tanto células fagocíticas como no fagocíticas. Luego de la invasión, la bacteria expresa efectores que le permiten escapar del fagosoma y replicarse en el citoplasma de la célula hospedadora. Uno de estos efectores es una toxina formadora de poros dependiente de colesterol, denominada listeriolisina O (LLO). Esta proteína forma poros en la membrana del

fagosoma, desacoplando el gradiente de pH y Ca^{+2} necesarios para la maduración del mismo. Asimismo, en el fagosoma la bacteria expresa dos fosfolipasas C, PlcA y PlcB, que actúan junto a LLO y permiten la disrupción de la vacuola. Una vez en el citoplasma, *L. monocytogenes* se replica rápidamente y, mediante la proteína ActA, recluta la maquinaria de polimerización de actina Arp2/3 del hospedador. Posteriormente, se induce la formación de una cola de actina en un polo de la bacteria, la cual le permite propulsarse y diseminarse a células vecinas. Asimismo, ActA está implicada en la evasión de los procesos autofágicos cuando *L. monocytogenes* reside en el citoplasma; y se sugiere que la actina circundante al patógeno impediría el reconocimiento del mismo por la maquinaria del hospedador (Levine *et al.*, 2011). Sin embargo durante la infección en macrófagos, una población de *L. monocytogenes* que aún no ha escapado del fagosoma es capturada por la maquinaria autofágica de la célula y en este mecanismo también está involucrada LLO, posiblemente por el daño originado en las membranas. Esta población puede sufrir diversos destinos: degradarse en autolisosomas, escapar del autofagosoma mediante la acción de LLO, PlcA y PlcB, o residir en estructuras similares a autofagosomas denominados SLAPs (del inglés **S**pacious **L**isteria-containing **p**hagosomes), donde la bacteria es capaz de establecer una infección persistente (Cassidy *et al.*, 2012; Lopez-Castejon *et al.*, 2012; Tattoli *et al.*, 2013). En resumen, *L. monocytigenes* es capaz de subvertir el proceso autofágico mediante dos vías: bloquear la maduración de fagosomas LC3 positivos a través de la acción de LLO y evadir la captura del autofagosoma en el citosol mediante ActA y otros determinantes de virulencia (Cemma & Brumell, 2012).

Shigella flexneri es una bacteria Gram negativa, que ingresa al hospedador por vía fecal-oral e invade células M de la barrera epitelial, para luego diseminarse a otras células. Además, resiste la fagocitosis en macrófagos por inducir apoptosis celular (Schroeder & Hilbi, 2008). Una vez que el patógeno ha ingresado a la célula, rompe la membrana del fagosoma y escapa al citoplasma celular donde se replica. La lisis de la membrana no depende de la acidificación de la vacuola y es mediada por tres proteínas secretadas por el SST3: IpaB, IpaC e IpaD (Mounier *et al.*, 2009; Picking *et al.*, 2005). En el sitio de entrada de *Shigella* se reclutan proteínas NOD, que detectan el proceso de invasión como una señal de peligro, lo cual activa la vía autofágica en el citosol de la célula infectada. Al mismo tiempo, los remanentes de membranas generados por el escape de *Shigella* al citosol, son ubiquitinados o detectados por galectina 3, 8 y 9 y reconocidos por receptores de autofagia (Mostowy & Cossart, 2012; Randow & Münz, 2012). Una vez en el citoplasma, *S. flexneri* expresa la proteína IcsA que induce la polimerización de actina, a través del reclutamiento de N-

WASP y Arp2/3. De esta manera, se forma una cola de actina que permite la propulsión del patógeno y la diseminación a otras células (Iretón, 2013). En esta instancia, *S. flexneri* es reconocida por la maquinaria autofágica celular, debido que IcsA interacciona con la proteína Atg5 requerida para la formación de autofagosomas. Sin embargo esta bacteria secreta otro efector denominado IcsB que se une competitivamente a IcsA, inhibiendo la unión con Atg5 y protegiendo al patógeno de la respuesta inmune del hospedador (Huang & Brumell, 2009; Levine *et al.*, 2011). Las septinas, una familia de componentes del citoesqueleto que unen GTP, evitan la movilidad dependiente de actina al formar estructuras similares a jaulas alrededor de *Shigella*, la cual colocaliza con NDP52, p62 y LC3, sugiriendo que estas estructuras son blanco de autofagia selectiva (Randow & Münz, 2012).

Coxiella burnetii es un patógeno intracelular obligado, Gram negativo. Esta bacteria presenta un desarrollo bifásico que consiste en la variante infecciosa caracterizada por células pequeñas (SCV, del inglés **S**mall **c**ell **v**ariant) y una variante replicativa caracterizada por células más grandes (LCV, del inglés **L**arge **c**ell **v**ariant) (Voth and Heinzen, 2007). Este patógeno es capaz de infectar células fagocíticas mediante la integrina de respuesta a leucocitos $\alpha V\beta 3$. Cuando SCV hace contacto con este receptor, se activa una cascada de señales en el macrófago que induce polimerización de actina y la formación del fagosoma. Luego de la internalización, el fagosoma conteniendo a *C. burnetii* transita por la vía endocítica normal adquiriendo marcadores de endosoma temprano y tardío (Ghigo *et al.*, 2012). Simultáneamente, el patógeno comienza a alterar el programa de maduración, reclutando en su vacuola la proteína autofágica LC3 y retrasando la fusión con lisosomas (Gutierrez *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2007). En este lapso, la bacteria inicia la transición a la variante replicativa LCV, y al cabo de 48 horas, *C. burnetii* reside en compartimentos espaciosos con características de autofagosomas y lisosomas. Esta gran vesícula presenta pH aproximado a 4,8 y constituye la vacuola replicativa del patógeno (Cemma & Brumell, 2012; Ghigo *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que causa un amplio rango de enfermedades infecciosas que pueden llevar al shock séptico y tóxico. Luego de la invasión en células epiteliales, *S. aureus* se puede encontrar en vacuolas de tipo autofágicas, caracterizadas por la doble membrana y la colocalización con LC3. Este proceso es dependiente de *agr*, un regulador global de la virulencia de *S. aureus*. Los autofagosomas que contienen a *S. aureus* no se fusionan con lisosomas, creando un nicho para la replicación bacteriana. Luego de la replicación, *S. aureus* escapa del

autofagosoma al citoplasma e induce la muerte celular mediante apoptosis. Por lo tanto, la maquinaria autofágica es esencial para la replicación bacteriana y la muerte de la célula hospedadora. La α -hemolisina (Hla) es una proteína formadora de poros secretada por *S. aureus* que puede disparar autofagia. El daño de membrana mediado por Hla es necesario para el reclutamiento de marcadores autofágicos (como LC3) al fagosoma que contiene a *S. aureus*. Dado que el proceso de autofagia inducido por Hla requiere Atg5 pero no Beclina1 o la PI3K, se sugiere la participación de una vía autofágica no canónica para prevenir la maduración del autofagosoma que contiene a *S. aureus* (Mostowy & Cossart, 2012).

3 - *Drosophila melanogaster*

3.1 - Modelo de estudio

D. melanogaster, también llamada mosca de la fruta o mosca del vinagre, es una especie de díptero braquícero de la familia Drosophilidae. Recibe su nombre debido a que se alimenta de frutas en proceso de fermentación. Es una especie utilizada recurrentemente en experimentación genética, dado que posee un reducido número de cromosomas (4 pares), su genoma se encuentra secuenciado, posee un breve ciclo de vida (15-21 días) y aproximadamente el 61 % de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genomas de *Drosophila* y el 50 % de las secuencias proteicas tienen análogos en los mamíferos (Reiter *et al.*, 2001).

Drosophila ha emergido como un importante modelo para examinar las funciones de genes que son relevantes en diversas enfermedades humanas que afectan un amplio espectro de tipos celulares. Además, este organismo modelo es hospedador de una sorprendente variedad de patógenos fúngicos, bacterianos y virales. Posee un tiempo de generación corto, la estructura de sus órganos son simples pero análogas a la de mamíferos y se puede expandir su número a muy bajo costo (Panayidou *et al.*, 2014). Su sistema digestivo es estructural y funcionalmente similar al de mamíferos y se encuentra en constante contacto con patógenos microbianos ya que estos insectos ingieren grandes cantidades de microorganismos al alimentarse de frutas en descomposición (Kuraishi *et al.*, 2013). Existen múltiples herramientas genéticas para abordar los mecanismos de acción de distintos patógenos en *Drosophila*. Estas herramientas incluyen búsquedas genéticas o mediadas por ARNi (ARN de interferencia) en líneas celulares o insectos con el fin de identificar vías del hospedador necesarias en la defensa contra el organismo

patógeno. De manera recíproca, también es posible realizar la búsqueda de factores codificados por el patógeno requeridos en la virulencia. Los estudios *in vivo* en *Drosophila* son facilitados por la capacidad de expresar directamente transgenes codificados por el hospedador o por el patógeno en tipos celulares específicos (Bier & Guichard, 2012).

En los últimos años *Drosophila* ha permitido la identificación de varios factores de virulencia de distintos patógenos oportunistas. Algunos microorganismos utilizan mecanismos similares para infectar insectos y mamíferos y muchos factores de virulencia efectivos contra mamíferos también son responsables de la patogenicidad en *Drosophila*. Como resultado de esto, un gran número de microorganismos importantes para la salud humana han sido estudiados en el contexto de este insecto (Panayidou *et al.*, 2014).

Las infecciones humanas en heridas, sistémicas o intestinales pueden ser mimetizadas fácilmente en *Drosophila* a través de ensayos de herida séptica, inyección e infección oral, respectivamente. El método de herida séptica en el tórax o abdomen involucra el uso de una aguja embebida en una solución bacteriana. Si los insectos se lastiman en el tórax, la herida ocurre en la cutícula y el músculo que se encuentra por debajo. Luego de la inoculación la bacteria puede proliferar localmente y diseminarse a través del cuerpo del insecto, lo que lleva a un daño tisular y respuesta inmune local y sistémica. Un segundo método utiliza una jeringa inyectora que produce principalmente la inoculación sistémica de las bacterias. Utilizando este método, la inyección ocurre directamente en la hemolinfa del insecto evitando la barrera del sitio de la herida (Panayidou *et al.*, 2014).

El modelo de infección oral, permite mimetizar la infección intestinal en mamíferos e introducir los microorganismos en el tracto intestinal de *D. melanogaster*. Este método posee la ventaja de permitir la fácil cuantificación de la regeneración epitelial intestinal, que es dirigida por vías de señalización evolutivamente conservadas (Panayidou *et al.*, 2014).

3.2 - Inmunidad

3.2.1 - Respuesta epitelial y flora intestinal

Anatómicamente el intestino de *Drosophila* puede dividirse en intestino anterior, medio y posterior. El sistema digestivo superior es utilizado para la incorporación y

almacenamiento del alimento, mientras que el procesamiento y la absorción ocurre en las regiones media y posterior del intestino medio. La presencia de células madres intestinales (ISCs, del inglés intestinal stem cells) asegura la homeostasis intestinal al suministrar enterocitos (ECs) diferenciados. Una característica de los enterocitos es su rápido recambio, en el cual las células apoptóticas son reemplazadas por la proliferación compensatoria de las ISCs. De manera similar a lo que ocurre en mamíferos, las vías Notch, Wingless, del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del receptor de insulina están implicadas en el mantenimiento, proliferación y diferenciación de las ISCs (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

La matriz periotrónica es una estructura acelular que forma una capa de polímeros de quitina y glicoproteínas que reviste el lumen del intestino medio de *Drosophila*. A pesar de las diferencias estructurales se considera que esta matriz es homóloga a la capa de mucus del tracto intestinal de mamíferos y protege al epitelio intestinal de alimentos abrasivos y microbios (Kuraishi *et al.*, 2013).

Las células intestinales deben tolerar a las bacterias comensales mientras que deben montar una vigorosa respuesta ante la presencia de patógenos. Una importante vía implicada en la distinción entre estos tipos de microorganismos es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) por la oxidasa dual (Duox) de membrana. En presencia de bacterias comensales y ausencia de especies patogénicas, bajos niveles de activación de la vía IMD del sistema inmune innato inducen una retroalimentación negativa de la vía Duox, tanto a nivel de expresión como de actividad, resultando en un nivel basal bajo de ROS. Por el contrario, cuando el sistema inmune del hospedador detecta bacterias patógenas, la expresión y actividad de los componentes de la vía Duox aumentan, lo que conlleva a la destrucción de la bacteria (Bier & Guichard, 2012). Recientemente se ha reportado que el uracilo liberado en mayor cantidad por bacterias patogénicas permitiría al sistema Duox discernir entre patógenos y simbiosis (Kuraishi *et al.*, 2013). El sistema Duox trabaja en paralelo a otras vías del sistema inmune, como la vía de las quinasas Jun N-terminal (JNK). La vía JNK es activada en las células epiteliales intestinales luego de la ingestión de *Pseudomonas aeruginosa* y permite la proliferación de ISCs para compensar la pérdida de las células infectadas. La infección oral de *D. melanogaster* con el patógeno natural *Erwinia carotovora* sugiere que la homeostasis intestinal es mantenida por la reparación del daño celular causado por la bacteria. La vía Duox retroalimenta las vías que controlan la apoptosis y a la proliferación de

células madres para asegurar la reparación del daño celular generado por la exposición a ROS (Bier & Guichard, 2012).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés **antimicrobial peptides**) son péptidos que pueden dañar y eliminar microbios. Además, los AMPs producidos por el cuerpo graso ante una infección sistémica son necesarios para la defensa del hospedador. Existen dos vías de señalización que controlan la expresión de AMPs en la respuesta inmune sistémica, la vía Toll y la vía IMD. Sin embargo, en el intestino la vía IMD controla la generación de AMPs. Esta respuesta inmune del intestino es activada por el reconocimiento de peptidoglicano (PGN) del tipo ácido diaminopimérico (DAP) por receptores de reconocimiento de patrones de peptidoglicano (Kuraishi *et al.*, 2013).

3.2.2 - Componentes de la Inmunidad sistémica

3.2.2.1 - Hemocitos

Drosophila contrarresta infecciones sistémicas a través de la acción de los hemocitos, considerados como los equivalentes de las células sanguíneas de mamíferos (Figura 4). Existen tres tipos de hemocitos: los plasmocitos, que son células similares a los monocitos y están involucrados en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos y patógenos; las células cristal, requeridas para la melanización y los lamelocitos, involucrados en la encapsulación de cuerpos extraños demasiado grandes para ser fagocitados. Los lamelocitos no se forman en condiciones normales, sino que lo hacen en respuesta a desafíos inmunes específicos (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

3.2.2.2 - Fagocitosis

Uno de los mecanismos más inmediatos y poderosos que posee *Drosophila* para eliminar cuerpos apoptóticos, infecciones bacterianas o esporas de hongos es su remoción mediante el reconocimiento mediado por receptores y la fagocitosis (Figura 4) (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

3.2.2.3 - Melanización

Es la reacción más grave o aguda del insecto contra patógenos que rompen la cutícula e invaden mediante herida séptica (Figura 4). Se observa que en el sitio de la herida y en la superficie del patógeno se acumula melanina y esta reacción es utilizada

para encapsular y secuestrar patógenos demasiado grandes para ser fagocitados. Además, los intermediarios de reacción son directamente tóxicos para los microbios (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

3.2.2.4 - Coagulación

Un componente adicional de la respuesta innata para restringir la diseminación del patógeno en el sitio de la herida es el proceso de coagulación de la hemolinfa (Figura 4). En el coágulo, varias proteínas forman filamentos que se entrecruzan con la bacteria y evitan su diseminación (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

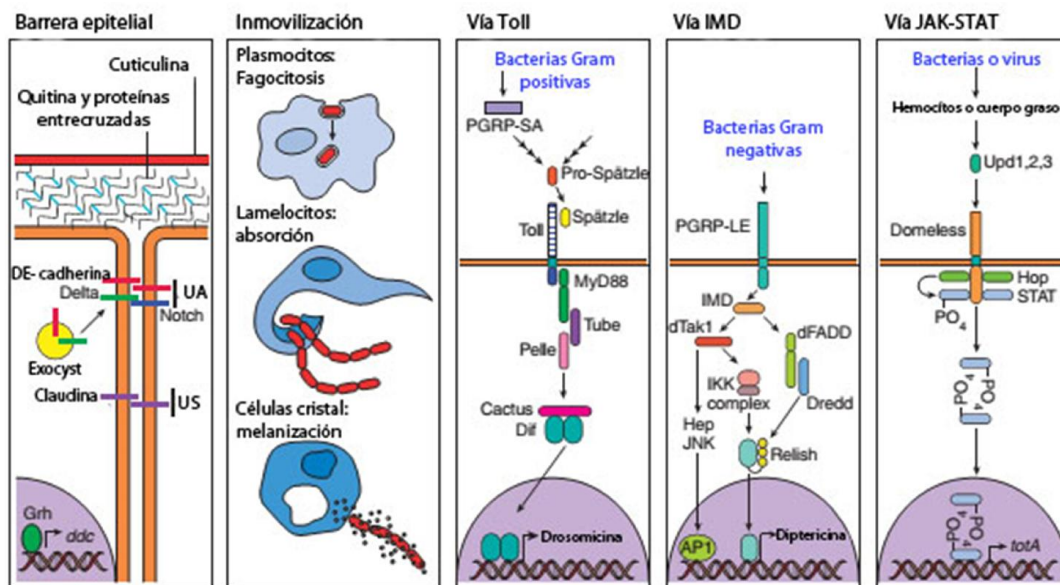


Figura 4. Esquema de las vías de defensa de *Drosophila*. La barrera epitelial consiste en proteínas secretadas que forman una cutícula externa dura, compuesta por una capa interna de proteínas y quitina entrecruzadas y una capa externa de cuticulina. Además, existe una fuerte barrera entre células, que consiste en una zona adhesiva basolateral (que involucra uniones adherentes, UA) y uniones más fuertes hacia la zona basal (uniones septadas, US) las cuales evitan el libre pasaje de patógenos, macromoléculas y solutos entre los espacios extracelulares. Proteínas como las cadherinas (DE-cadherina en *Drosophila*), cateninas y moléculas de señalización, como el receptor Notch y su ligando Delta, se localizan en las UA mediante el complejo "exocyst". Las claudinas que localizan en las US juegan un importante rol en formar una estructura sellada que evita que grandes moléculas u objetos pasen libremente entre las células. **Inmovilización:** hay tres tipos de células sanguíneas (hemocitos) en *Drosophila*: plasmocitos, los cuales unen al patógeno y lo fagocitan; lamelocitos, los cuales envuelven a los cuerpos foráneos y los absorben; y células cristal, las cuales expresan las enzimas requeridas para producir y secretar melanina para enjaular e inmovilizar a los patógenos. La **vía de señalización Toll** media la respuesta a muchas bacterias Gram positivas y hongos, que en muchos casos son reconocidos cuando PGRPs secretados inician una cascada proteolítica extracelular que culmina en el procesamiento de Spätzle. Una vez activado, Toll recluta un complejo de proteínas que resultan en la disociación del inhibidor Cactus del factor de transcripción tipo NF- κ B Dif, y la activación de la transcripción de los genes dependientes de Toll, como drosomicina. En la **vía IMD**, las bacterias Gram negativas son detectadas por PGRPs transmembrana que activan la proteína citoplasmática IMD. Por un lado, se activa la proteína Relish, la cual entra al núcleo y activa la expresión de los genes controlados por la vía IMD, como diptericina. Por otro lado se activan las vías de señalización JNK y p38. La **vía de señalización JAK-STAT**: la infección de los insectos lleva a la producción de señales como el ligando Upd que se une y activa el receptor Domeless y activa la quinasa Janus (JAK), cuya vía activa la transcripción de genes efectores blancos de esta vía de señalización. Adaptado de Bier y Guichard, 2012.

3.2.2.5 - Inducción de AMPs dependiente del cuerpo graso

La inducción de AMPs dependiente del cuerpo graso es la síntesis y secreción de poderosas moléculas efectoras a la hemolinfa. Como se mencionó anteriormente, los AMPs son pequeños péptidos catiónicos que atacan directamente la pared celular bacteriana (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

3.2.3 - Regulación de la inmunidad sistémica

3.2.3.1 - La vía Toll

A diferencia de lo que sucede en mamíferos, la vía Toll de *Drosophila* no es activada por interacción directa con moléculas de origen microbiano, sino a través de ligandos endógenos, principalmente la citoquina Spätzle (Spz) (Figura 4). La unión dispara un cambio conformacional en el cual un receptor Toll ahora dimérico, dispara la vía de señalización corriente abajo. Spz es activado para unirse a Toll a través de una cascada proteolítica que culmina en el procesamiento del pro-dominio N-terminal de Spz, mediante la enzima activadora de Spz SPE (del inglés **Spz-activating enzyme**). SPE es el punto donde la información obtenida del reconocimiento del patógeno se integra, mediante la activación de tres posibles vías de reconocimiento. Una de las vías es disparada por proteasas fúngicas o bacterianas que directamente activan a la serin-proteasa del hospedador Perséfone, la cual en este contexto actúa como sensor de virulencia. La segunda vía se activa mediante el reconocimiento de la pared celular fúngica y la tercera mediante peptidoglicano bacteriano de tipo lisina. Los eventos de reconocimiento son mediados por dos PGRPs (del inglés **peptidoglycan recognition protein**) y la proteína de unión a glucano (GNBP1) (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

Luego de la interacción Spz-Toll se forma un complejo receptor-adaptador que transmite la señal desde la superficie celular al núcleo (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012).

5.3.2.2 - La vía IMD

Además de la vía de señalización Toll existe otra vía de regulación, activada por peptidoglicano de tipo DAP, la vía IMD (Figura 4). El peptidoglicano de tipo DAP se forma en la pared celular de bacterias Gram negativas y algunos bacilos Gram positivos. El reconocimiento de patógenos en esta vía ocurre a través de la proteína

transmembrana PGRP-LC y la proteína intracelular PGRP-LE (Kounatidis & Ligoxygakis, 2012). Estos receptores activan la vía IMD intracelular a través de proteínas adaptadoras como IMD y Kenny o KEY, lo que en última instancia produce la traslocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B Relish y la inducción de múltiples genes para AMPs como *Cecropina*, *Attacina*, *Defensina*, *Drosocina* y *Diptericina* (Nehme *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, la vía IMD está involucrada en la inducción de AMPs en el tracto intestinal de *Drosophila* (Ferrandon, 2013). La presencia de reguladores negativos de la vía IMD asegura un nivel apropiado en la respuesta inmune del tracto intestinal para establecer tolerancia hacia los microorganismos comensales. Algunos de estos reguladores negativos se encuentran regulados positivamente por la activación de la vía IMD, estableciendo una retroalimentación negativa que ajusta la magnitud de la producción de AMPs en el tracto intestinal. Los PGRPs son proteínas evolutivamente conservadas involucradas en el reconocimiento y degradación de peptidoglicano. Los PGRP pertenecientes a la familia de las amidasas catalizan la degradación de peptidoglicano, lo cual reduce los niveles de los ligandos que activan la vía IMD en el tracto intestinal. Otro tipo de reguladores negativos directamente suprimen la actividad de los receptores PGRP y la vía IMD, bloqueando la dimerización de estos receptores o interfiriendo en la interacción con las proteínas adaptadoras (Kuraishi *et al.*, 2013).

3.3 - Infección por *Serratia marcescens*

S. marcescens es una bacteria entomopatógena y como se mencionó anteriormente, es capaz de invadir diversos hospedadores, incluyendo a humanos. La infección intestinal de *Drosophila* con *Serratia* causa una respuesta inmune local, pero las bacterias pueden atravesar el epitelio intestinal y acceder a la cavidad del hospedador. En una búsqueda *in vivo* en todo el genoma de *Drosophila* mediante ARNi utilizando insectos infectados con *Serratia* se identificó que la vía de señalización JAK-STAT es un importante inductor de la regeneración epitelial y un regulador negativo de las defensas del hospedador en una infección intestinal (Cronin *et al.*, 2010). Por el contrario, la activación de la vía IMD luego de la infección por *Serratia* induce la defensa del hospedador. Las bacterias que escapan a la hemolinfa son eliminadas mediante fagocitosis. Es más, las bacterias ingeridas que llegan a la hemolinfa no disparan una respuesta inmune sistémica, dejando a la respuesta inmune celular como la única defensa contra la proliferación bacteriana en la

hemolinfa. Eater, un receptor fagocítico de la familia de receptores scavenger que muestra una amplia especificidad para bacterias Gram negativas y Gram positivas media la respuesta celular contra *Serratia* (Chung & Kocks, 2011; Nehme *et al.*, 2007). Las moscas que carecen del gen *subdued*, un miembro de la familia de los canales de cloro activados por calcio TMEM16, acumulan más bacterias y sucumben más rápidamente que las moscas silvestres a la infección oral por *S. marcescens*, indicando un rol importante de este gen en la resistencia de *Drosophila* a la infección (Wong *et al.*, 2013). *S. marcescens* es capaz de causar patologías intestinales potencialmente letales, en concordancia con la habilidad de esta bacteria de dañar el epitelio mamífero. Mientras que la fagocitosis y la inducción de la vía IMD promueven la defensa del hospedador, la regeneración intestinal inducida por la vía JAK-STAT parece exacerbar la infección (Panayidou *et al.*, 2014).

El antígeno O, es el único factor de virulencia de *S. marcescens* cuya función pudo ser parcialmente descrita en *Drosophila*. La habilidad que posee *S. marcescens* Db11 de resistir la acción de AMPs *in vivo* depende principalmente en la presencia del Antígeno O (Nehme *et al.*, 2007).

Como se describe en esta sección, *Drosophila melanogaster* resulta ser un excelente modelo para imitar las condiciones de infección de *S. marcescens* en modelos de mamíferos. Sin embargo, los potenciales factores de virulencia que le otorgan capacidad infectiva a *Serratia* en este modelo, al igual que en el modelo de células eucariotas, se desconocen hasta la actualidad. Por esta razón, el laboratorio de la Dra. García Véscovi estableció una colaboración con el grupo del Dr. Ferrandon, perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de Estrasburgo, Francia. Este grupo está dedicado al estudio del sistema inmune (Ferrandon, 2013; Nehme *et al.*, 2011; Rutschmann *et al.*, 2002) y la respuesta intestinal de *Drosophila* ante distintos microorganismos patógenos, dentro de los cuales se encuentra *S. marcescens* Db11 (Cronin *et al.*, 2010; Kurz *et al.*, 2003; Nehme *et al.*, 2007). En el primero de una serie de viajes de intercambio, financiados por el programa ECOS, se realizaron una serie de ensayos de herida séptica e infección oral en *D. melanogaster* salvaje e insectos mutantes con *S. marcescens*, (estudios comparativos de la infección llevada a cabo con *S. marcescens* Db11 y la cepa objeto de estudio en nuestro laboratorio *S. marcescens* RM66262 y las distintas cepas mutantes derivadas de las mismas). Los resultados de dichos ensayos se recopilan en el capítulo 3 de esta tesis.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Como se describió en la Introducción General, *Serratia marcescens* es un patógeno oportunista de humanos que representa un problema creciente para la salud pública. Es capaz de causar infecciones en el sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario, neumonía y otras infecciones respiratorias, infecciones del torrente sanguíneo incluyendo endocarditis e infecciones de heridas (Mahlen, 2011). Si bien se han identificado diversos factores de virulencia potenciales producidos por *S. marcescens*, existen muy pocas publicaciones donde se explora en profundidad los mecanismos que utiliza para invadir, sobrevivir y proliferar dentro del hospedador (Fedrigo *et al.*, 2011; Hejazi & Falkiner, 1997; Nehme *et al.*, 2007).

En nuestro laboratorio, la Dra. Griselda Fedrigo demostró que *S. marcescens* es capaz de invadir células no fagocíticas por medio de la vía endosomal, y residir y multiplicarse dentro de ellas en grandes compartimentos rodeados de membrana que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3). *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial. Además, *Serratia* necesita un estado metabólicamente activo para inducir autofagia y ser capaz de invadir células CHO, pero no requeriría la fosfolipasa PhIA para estos procesos (Fedrigo *et al.*, 2011).

Por estas razones, como **Objetivo Principal** de esta tesis, nos proponemos:

✓ Determinar los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de invasión a la célula eucariota y completar el modelo de infección para *S. marcescens* propuesto anteriormente (Fedrigo *et al.*, 2011).

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

✓ Dilucidar el tráfico intracelular que realiza *S. marcescens*, luego de la internalización en la célula hospedadora.

✓ Caracterizar el rol fisiológico de la hemolisina ShIA en el proceso de invasión y ciclo intracelular.

✓ Caracterizar el rol de potenciales factores de virulencia de la bacteria en el modelo de infección *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 - Líneas celulares, cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las líneas celulares y cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis se describen en la Tabla 1.

TABLA 1.

Línea celular	Características relevantes	Referencia
CHO	Células epiteliales provenientes de ovario de hámster.	(Romano <i>et al.</i> , 2007)
CHO-EGFP-LC3	Células epiteliales proveniente de ovario de hámster, transfectadas establemente con pEGFP:: <i>lc3</i> .	(Romano <i>et al.</i> , 2007)
MEF salvaje (<i>atg5^{+/+}</i>)	Fibroblastos embrionarios de ratón, salvajes.	(Romano <i>et al.</i> , 2007)
MEF <i>atg5^{-/-}</i>	Fibroblastos embrionarios de ratón, deficientes en la expresión de Atg5.	(Romano <i>et al.</i> , 2007)
HeLa	Células epiteliales de carcinoma humano	(Mestre <i>et al.</i> , 2010)
T24	Células epiteliales de vejiga humana	(Eiján <i>et al.</i> , 2003)
Cepa bacteriana	Genotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
XL-1 Blue	Derivada de <i>E. coli</i> K12. <i>supE44</i> , <i>hdsR17</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac</i> ^f <i>lacZ</i> , Δ M15:: <i>Tn10</i>], Tc ^R .	(Sambrook J, Fritsch EF, 1989)
XL-1 Blue/ <i>pshIBA</i>	Operón <i>shIBA</i> clonado en pBBR1MCS, Cm ^R	Este trabajo
SM10 (λ pir)	<i>thi-J</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, λ pir, Kn ^R .	(Simon R, Priefer U, 1983)
SM10 (λ pir)/ pKNOCK:: <i>shIB</i>	Fragmento interno de <i>shIB</i> clonado en pKNOCKGm.	Este trabajo
SM10 (λ pir)/ pKNOCK:Sp:: <i>shIB</i>	Fragmento interno de <i>shIB</i> clonado en pKNOCKGm, Sp ^R .	Este trabajo
HB101	HB101/pRK2013, genes Mob, KnR.	(Figurski & Helinski, 1979)

W3110/pES14	Operón <i>shlBA</i> clonado en pT7, Ap ^R .	(Poole <i>et al.</i> , 1988)
BL21/pLysS	DE3, pLysS	Cepario del laboratorio
BI21/pLysS, pES14	DE3, pLysS, Operón <i>shlBA</i> clonado en pT7, Ap ^R .	Este trabajo
<i>S. marcescens</i>		
Salvaje	Aislamiento clínico no pigmentado de paciente con infección urinaria.	(Castelli <i>et al.</i> , 2008)
<i>shlB</i>	Mutante insercional en <i>shlB</i> , Sp ^R	Este trabajo
<i>shlB/pshlBA</i>	Sp ^R Operón <i>shlBA</i> clonado en pBBR1MCS, Cm ^R	Este trabajo
<i>prtA</i>	Mutante insercional pKNOCK en <i>prtA</i> , Cm ^R	Cepario del laboratorio
<i>phiAB</i>	Mutante por delección de <i>phiAB</i> , Cm ^R	(Castelli <i>et al.</i> , 2008)
<i>rscB</i>	Mutante insercional en <i>rscB</i> , Gm ^R	(Castelli & Vescovi, 2011)
<i>flhD</i>	Mutante insercional en <i>flhD</i> , Cm ^R	(Fedrigo <i>et al.</i> , 2011)
<i>fliA</i>	Mutante insercional en <i>fliA</i> , Cm ^R	Cepario del laboratorio
<i>wecD</i>	Mutante insercional <i>wecD</i> ::mini-Tn5, Km ^R	(Castelli <i>et al.</i> , 2008)
<i>wecG</i>	Mutante insercional en <i>wecG</i> , Gm ^R	(Castelli & Vescovi, 2011)
<i>phoP</i>	Mutante insercional en <i>phoP</i> , Gm ^R	(Barchiesi <i>et al.</i> , 2012)
<i>mgtE1</i>	Mutante insercional <i>mgtE726</i> ::mini-Tn5, Km ^R	(Barchiesi <i>et al.</i> , 2012)
<i>mgtE2</i>	Mutante insercional pKNOCK en <i>mgtE2863</i> , Cm ^R	Cepario del laboratorio
<i>doble mgtE</i>	Mutante insercional en <i>mgtE726</i> y <i>mgtE2863</i> , Km ^R , Cm ^R	Cepario del laboratorio

Los plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pRFP::LC3	Vector de expresión en células eucariotas, fusión de LC3 a RFP.	(Mestre <i>et al.</i> , 2010)
pBBR1MCS	Vector de clonado, movilizable de mediano número de copias, Cm ^R .	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pshIBA	Operón <i>shIBA</i> clonado en pBBR1MCS, Cm ^R .	Este trabajo
pKNOCKGm	Vector suicida movilizable, Gm ^R .	(Alexeyev, 1999)
pKNOCK::shIB	Fragmento interno de <i>shIB</i> clonado en pKNOCKGm.	Este trabajo
pKNOCK:Sp::shIB	Fragmento interno de <i>shIB</i> clonado en pKNOCKGm, Sp ^R .	Este trabajo
pES14	Operón <i>shIBA</i> clonado en pT7, Ap ^R .	(Poole <i>et al.</i> , 1988)
pKRP13	Vector que posee cassette de resistencia a espectinomocina, Ap ^R , Sp ^R	(Reece & Phillips, 1995)
Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	
pKNOCK-ori-fw	TAAGGTTTAACGGTTGTGG	
FwmutshIB (BamH1)	CGCGGATCCCGCGTGCAAATTGTTC	
RevmutShIB (XhoI)	CCGCTCGAGCCGTACGGCAGCGAAT	

2 - Medios de cultivo

Las células epiteliales CHO (del inglés **C**hinese **h**ámster **o**vary) y CHO-GFP-LC3 fueron cultivadas en medio α -MEM (Invitrogen); y los fibroblastos MEF (del inglés **M**urine **e**mbrionic **f**ibroblast), las células epiteliales HeLa y T24 fueron crecidos en medio DMEM (Invitrogen). Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (Internegocios). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g/l de peptona de carne, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. Las cepas de *E. coli* y *S. marcescens* se crecieron a 30°C o 37°C, con o sin agitación, según se indica en cada caso. Para la preparación de medios sólidos se agregó agar al medio LB en una concentración final de 15 g/l. Los antibióticos empleados para los cultivos bacterianos fueron: ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), espectinomicina (50 µg/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

3 - Anticuerpos y reactivos

El anti-suero de conejo anti-*Serratia*, utilizado en los ensayos de microscopía como anticuerpo primario policlonal anti-*Serratia*, fue producido anteriormente en nuestro laboratorio inmunizando conejos con un cultivo de *S. marcescens* inactivado durante 30 min a 100°C, siguiendo el protocolo descrito (Castelli *et al.*, 2008). Los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados a Cy3 y Alexa Fluor647 y los reactivos fluorescentes LysoTracker, DQ-BSA y DAPI fueron provistos por Molecular Probes, Invitrogen. Los detergentes digitonina y saponina fueron provistos por Sigma Aldrich.

3.1 - Purificación de ShIA

En una primera etapa, la purificación de la hemolisina se realizó según el protocolo de Schönherr y col. (Schönherr *et al.*, 1994) con las siguientes modificaciones. Para la sobreexpresión de los genes de la hemolisina se usó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) transformada con el plásmido pES14, que codifica para el operón *shIAB* bajo control del promotor T7. Las células se crecieron en 50 mL de medio LB a 37°C y la expresión fue inducida a una $DO_{630} = 0,5$ con el agregado de IPTG 0,5 mM. Luego de una incubación de 2 hs, las células se centrifugaron a 6500 rpm por 15 min y el sobrenadante que contiene la proteína ShIA fue recuperado. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 45% de saturación, en hielo. Luego de incubar durante 1 hora con agitación continua, el sobrenadante precipitado se centrifugó a 15000 g durante 30 min en frío. La proteína se resuspendió en un 1 mL de buffer Hepes 50 mM, pH=8 y fue desalada mediante una columna de desalado en HPLC. El eluato, que fue recuperado en 3 mL de solución buffer, se aplicó de a 1 mL a una columna de intercambio catiónico Mono-S equilibrada con buffer Hepes 50 mM, pH=8. La columna se lavó con 15 ml de este buffer y las proteínas unidas se eluyeron

con un gradiente lineal de NaCl (0 - 500 mM) en 25 ml de Hepes 50 mM pH=8. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se sometieron a SDS/PAGE.

En la figura 5 podemos advertir que una fracción de la proteína no fue retenida por la columna, ya que se puede observar la banda proteica correspondiente a la hemolisina en las fracciones recolectadas de la columna durante y momentos después de la siembra de la muestra (Eluato post-siembra). Esto implica que la columna se saturó de proteína o bien, que la interacción no fue lo suficientemente fuerte para retenerla. En las fracciones del gradiente se pueden observar las muestras recuperadas con NaCl 150 mM, fuerza iónica a la cual se predice que ShIA eluya según los antecedentes de la bibliografía (Schonherr *et al.*, 1994). Las muestras no mostraron ninguna banda proteica bajo estas condiciones, por lo que la proteína no se estaría reteniendo adecuadamente en la columna.

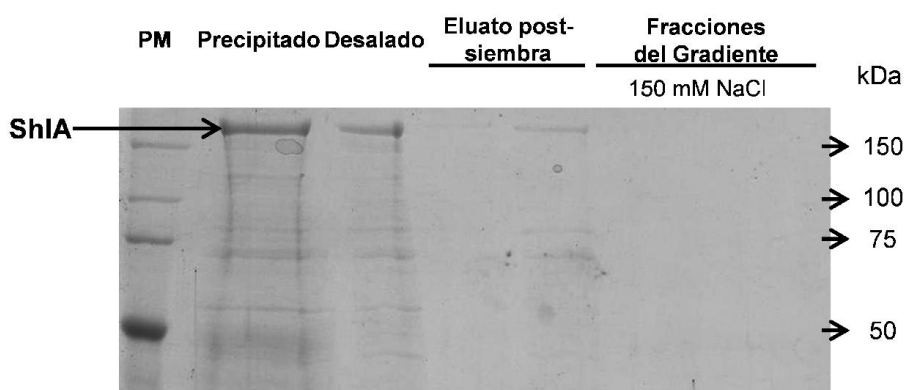


Figura 5. Purificación de ShIA mediante columna de intercambio catiónico. El sobrenadante del cultivo de la cepa BL21/pLysS, pES14 se precipitó con sulfato de amonio al 45% de saturación, en hielo y se centrifugó a 15000 g durante 30 min en frío (**precipitado**). La proteína se resuspendió en un volumen adecuado de buffer y fue desalada mediante HPLC (**desalado**). El eluato se aplicó a una columna Mono-S (**Eluato post-siembra**). La columna se lavó y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (**Fracciones del Gradiente**). **PM**: Marcador de peso molecular, los valores en kDa se encuentran a la derecha de la imagen; **ShIA**: hemolisina, se muestra la posición de la banda a la izquierda de la imagen.

Dado que ShIA tiene un alto grado de homología con la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (FHA), se intentó purificar ShIA siguiendo el protocolo descrito por Jacob-Dubuisson, 1996 (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996) en el que se utiliza una columna de heparina y la proteína unida se eluye con NaCl 500mM. En este caso se utilizó buffer Tris 20 mM pH=8 y un gradiente de NaCl (0-1,5 M).

Al igual que con la columna de intercambio catiónico, las fracciones recolectadas durante y en los momentos posteriores a la siembra de la muestra permiten detectar que una fracción de la muestra inyectada no queda retenida en la columna (Figura 6, Eluato post-siembra). Dado que la cantidad de proteína inyectada

(0,5 a 1 mg) es menor que el límite de saturación estimado de la columna (4 mg de proteína/columna), esto sugiere que la proteína no es retenida en su totalidad en la columna, ya sea porque la interacción entre ShIA y heparina no es específica o no es lo suficientemente fuerte. En las fracciones recuperadas luego del gradiente de NaCl se observa la misma concentración de ShIA que en las fracciones que eluyeron luego de la inyección y varias bandas proteicas de menor peso molecular (Figura 6, Fracciones del gradiente). Esto implica que una fracción de la muestra se quedaría retenida en la columna, debido a la interacción con heparina. Sin embargo, no se observa un proceso de enriquecimiento específico de la proteína ShIA, lo que implicaría que la muestra se estaría diluyendo al pasar por la columna, sin lograr su purificación.

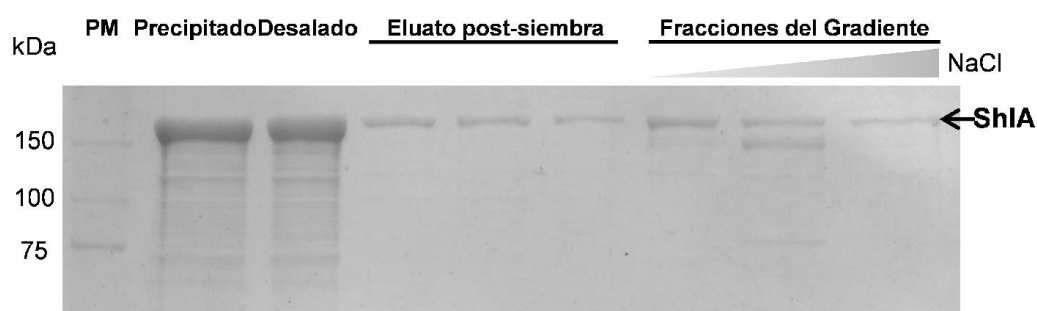


Figura 6. Purificación de ShIA mediante columna de heparina. El sobrenadante del cultivo de la cepa BL21/pLysS;pES14 se precipitó con sulfato de amonio al 45% de saturación, en hielo y se centrifugó a 15000 g durante 30 min en frío (**precipitado**). La proteína se resuspendió en un volumen adecuado de buffer y fue desalada mediante HPLC (**desalado**). El eluato se aplicó a una columna de Heparina (**Eluato post-siembra**). La columna se lavó y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (**Fracciones del Gradiente**). **PM**: Marcador de peso molecular, los valores en kDa se encuentran a la izquierda de la imagen; kDa: kiloDaltons; **ShIA**: hemolisina, se muestra la posición de la banda a la derecha de la imagen.

Luego, se intentó purificar ShIA utilizando una columna de exclusión molecular HiLoad 16/60 Superdex 200 cuyo rango de separación es de $10^3 - 10^5$ Da. En este caso se utilizó el buffer recomendado para la columna (fosfato 50 mM, NaCl 0,15 M pH=7) y se inyectó 2 ml de muestra. Como podemos observar en la figura 7, las fracciones recolectadas de la columna que contienen ShIA, no poseen la proteína totalmente purificada ya que, además de la proteína ShIA, se observa un patrón de bandas proteicas de menor peso molecular en las muestras analizadas.

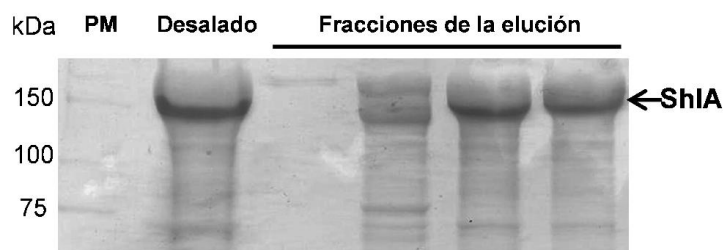


Figura 7. Purificación de ShIA mediante columna HiLoad 16/60 Superdex 200. El sobrenadante del cultivo de la cepa BL21/pLysS;pES14 se precipitó, la proteína se resuspendió en un volumen adecuado de buffer y fue desalada mediante HPLC (**Desalado**). El eluato se aplicó a una columna de exclusión molecular, y se utilizó el buffer recomendado por el fabricante (**Fracciones de la Elución**). **PM**: Marcador de peso molecular, los valores en kDa se encuentran a la izquierda de la imagen; kDa: kiloDaltons; **ShIA**: hemolisina, se muestra la posición de la banda a la derecha de la imagen.

3.2 - Preparación de Anticuerpos anti-ShIA

Las muestras obtenidas de la columna de exclusión molecular se utilizaron para la preparación de anticuerpos anti-hemolisina en conejo empleando una relación 1:1 con adyuvante incompleto de Freund, y siguiendo un protocolo de inyección como el descrito anteriormente (Castelli *et al.*, 2008).

3.3 – Purificación de Anticuerpos anti-ShIA (Stripping)

Las muestras proteicas utilizadas para hacer los anticuerpos se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (sección 6.3 y 6.5). La membrana se tiñe de manera reversible con una solución de Rojo Ponceau 0,01 % en ácido acético 0,1 %, con el fin de localizar la banda correspondiente a la hemolisina y cortar el exceso de membrana. El fragmento de membrana se bloquea como se describe en la sección 6.5 y se incuba con anticuerpo anti-hemolisina diluido 1/100 en buffer TBS durante 3 horas. Luego, la membrana se lava durante 20 min con 150 mM NaCl y buffer TBS. El anticuerpo se recupera en 200 μ l de glicina 0,2 M y EGTA 1 mM, pH= 2,8 y se neutraliza inmediatamente con Tris-base 1 M. Este paso se repite por lo menos 3 veces para recuperar la máxima cantidad de anticuerpo posible. Las fracciones recuperadas se diluyen con 1/10 parte de buffer TBS y se almacenan a -20 °C.

4 - Técnicas moleculares

4.1 - Ácidos nucleicos

4.1.1 - Extracción de ADN bacteriano genómico

El ADN cromosomal de las cepas de *S. marcescens* se extrajo a partir de 5 ml de cultivo saturado de bacterias crecidas en medio LB a 37°C con agitación constante. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 2,5 ml de 10 mM Tris pH 8,0; 25 mM EDTA y 50 mM NaCl. Se repitió la centrifugación y el sedimento celular se resuspendió en 2,5 ml de 10 mM Tris pH 8,0 y 25 mM EDTA. Luego se agregaron 275 µl de 2 mg/ml lisozima (Sigma) y se incubó 15 min a 37°C. Se adicionaron 300 µl de una solución 10% (p/v) Sarkosyl y 30 µl de Proteinasa K 1 mg/ml (Invitrogen), y se incubó 1 h a 55°C. La mezcla viscosa resultante se pasó varias veces a través de una jeringa descartable con aguja. Posteriormente, para finalizar la extracción de ADN, se realizaron extracciones sucesivas con fenol equilibrado en 100 mM Tris pH 8,0; conservando siempre la fase acuosa. Se realizó una última extracción con un volumen de la mezcla fenol:cloroformo en relación 1:1 (v/v) y se recuperó nuevamente la fase acuosa. El ADN cromosomal disuelto en esta fase fue precipitado al agregar 1/9 partes en volumen de 3M acetato de amonio y 1 volumen de isopropanol. La mezcla se centrifugó 20 min a 13000 rpm, el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de 80% (v/v) etanol y se secó a temperatura ambiente. El ADN cromosomal se resuspendió en 50 µl de agua estéril y su concentración fue determinada midiendo absorbancia a 260 nm, según la siguiente fórmula:

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

La pureza de la preparación se evaluó a través del cociente ($\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$). Un valor entre 1,7 y 2,0 indicó que el ADN se hallaba libre de proteínas y fenol (Sambrook J, Fritsch EF, 1989). Además se analizó el ADN genómico obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), como se indica en la sección 4.1.5.

4.1.2 - Preparación de ADN bacteriano plasmídico

La extracción de plásmidos a partir de células de *E. coli*, previamente transformadas, se realizó creciendo las bacterias durante toda la noche a 37°C, con agitación constante en 3 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El cultivo se centrifugó y las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 350 µl de

solución STET (50 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 8% sacarosa y 5% Tritón X-100). Luego se adicionó 10 µl de una solución conteniendo 10 mg/ml lisozima, 1 mg/ml ARNasa, 50 mM Tris pH 8,0 y 50% glicerol. La mezcla se incubó 1 min a 100°C y, posteriormente, se centrifugó 10 min a 13000 rpm. Con un palillo estéril se removió el pellet y se conservó el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico. Se realizó una extracción con 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo en relación 1:1 (v/v) y se recuperó la fase acuosa. El ADN se precipitó agregando 1/10 partes en volumen de acetato de amonio 3 M y 1 volumen de isopropanol. Se incubó la mezcla a -20°C durante al menos 1 hora y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm. El ADN precipitado se lavó con 1 ml de 80% (v/v) etanol y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Alternativamente, para obtener ADN plasmídico de mejor calidad, se utilizó un kit comercial Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.3 - Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de fragmentos por PCR se siguió un protocolo básico consistente en la desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 4 min, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C, anillado de los cebadores entre 50 y 60°C (dependiendo de las características de los oligonucleótidos) y elongación del ADN a 72°C para *Taq* Polimerasa o 68 °C para *Pfx* ADN Polimerasa, para cada ciclo. Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 45 segundos cada uno, y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (1 min por cada 1 kpb). Finalmente, se incluyó una etapa de extensión a 72°C o 68 °C durante 10 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient. El volumen final de las reacciones fue de 50 µl conteniendo: Solución 1X de amplificación comercial, suplementada con 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidostrifosfatos, dATP; dGTP; dCTP y dTTP (Invitrogen), 1 µg de ADN molde, 10 pmoles de oligonucleótidos directo y reverso y 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) o de *Pfx* ADN Polimerasa (Invitrogen). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en la sección 4.1.5.

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

La reacción de amplificación de ADN se realizó a partir de una colonia bacteriana disuelta en un volumen de 50 μ l de H₂O destilada estéril. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo: solución de amplificación comercial suplementada con 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidostrifosfato, dATP; dGTP; dCTP y dTTP (Invitrogen), 1 μ l de la suspensión de bacterias, 5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos (directo y reverso) y 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen). Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla 2. 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 4.1.5.

4.1.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN plasmídico, y los fragmentos de restricción y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración. Se utilizó el sistema de tipo submarino (Sambrook). La solución reguladora TBE 0.5X (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1mM EDTA) se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. A estos últimos se les agregó el agente intercalante bromuro de etidio en una concentración de 0,3 g/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. Como marcador de peso molecular se utilizó 1Kb DNA Ladder (Gibco, Life Technologies). La corrida electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA y, una vez finalizada, los fragmentos de ADN se detectaron empleando un captador de imágenes Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) y el programa QuantityOne.

4.1.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o luego de la digestión con enzimas de restricción fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante la tecnología de adsorción provista por el kit comercial PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.1.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las condiciones de digestión usadas en cada caso fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. Los volúmenes de reacción variaron entre 20 y 30 μ l, utilizándose aproximadamente 1U de enzima por μ g de ADN a digerir. El tiempo de incubación a las temperaturas recomendadas fue de 2 horas en la mayoría de los casos, pudiendo ser mayor según la enzima utilizada. El tamaño de los fragmentos de ADN digeridos con las enzimas de restricción se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa, como se describe en la sección 4.1.5.

4.1.8. - Reacciones de ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 1U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen), 1X solución de reacción comercial y los fragmentos de ADN a ligar en proporción 1:3 (v/v) de vector:inserto. Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16 °C. Posteriormente, las mezclas fueron sometidas a diálisis en gota contra agua esterilizada, utilizando discos de diálisis de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,025 μ m, Millipore) durante 40 min.

4.1.9 - Secuenciación de fragmentos de ADN

Fragmentos de ADN amplificados o insertos de ADN clonados en plásmidos fueron secuenciados a través del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Maine, USA (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/services>).

4.2 - Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E. coli*, o *S. marcescens*, se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria en el mismo medio, y se incubó a 37°C con agitación permanente hasta DO_{630} de 0,5 a 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó durante 5 min a 4°C y 6500 rpm. El sedimento celular obtenido se lavó 2 veces con 1 volumen de agua destilada estéril fría y 1 vez con 10 ml de 10% (v/v) glicerol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 0,6 ml de 10% (v/v) glicerol y se hicieron alicuotas en tubos estériles que fueron almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

4.3 - Transformación de células competentes y selección de transformantes

Se colocaron 40 µl de la suspensión de células competentes preparadas como se indica en la sección anterior en una celda de electroporación, se agregaron 1 a 10 µl del plásmido o mezcla de ligación 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 hora a 37°C con agitación constante. Las bacterias se concentraron por centrifugación, se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformantes, y se incubaron a 37°C durante una noche.

4.4 -Conjugación tripartita

Se cultivaron la cepa dadora (*E. coli* transformada con el plásmido a conjugar), la cepa aceptora (*S. marcescens*) y una cepa que contiene un plásmido auxiliar, *E. coli* HB101/pRK2013 en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C. Con un palillo estéril, se tomaron varias colonias de la cepa dadora y la cepa “Auxiliar” y se mezclaron con colonias de la cepa aceptora en una placa de LB-agar sin antibiótico. Dicha placa se incubó a 37°C durante toda la noche. Finalmente, las transconjugantes se seleccionaron repicando colonias de la placa anterior en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente al plásmido a conjugar y con un antibiótico al cual la cepa aceptora sea resistente. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

5 - Manipulación genética

5.1 - Construcción de la mutante *S. marcescens shIB::Sp*

La construcción de la mutante *S. marcescens shIB::Sp* (Figura 8) se realizó a través de una mutagénesis insercional dirigida; utilizando el vector suicida pKNOCK-Gm que interrumpió dicho gen (Alexeyev, 1999). Utilizando los cebadores Fw mut shIB (BamH1) y Rev mut ShIB (XhoI), se amplificó por PCR un fragmento interno del gen *shIB* de *S. marcescens* y el producto amplificado se separó electroforéticamente y se purificó de gel de agarosa, según se indica en las secciones 4.1.3 y 4.1.6. Posteriormente, el ADN purificado fue digerido con las enzimas BamHI (sitio incorporado durante la amplificación por el oligonucleótido Fw mut shIB) y XhoI (sitio

incorporado durante la amplificación por el oligonucleótido Rv mut shIB) y ligado en los mismos sitios del vector pKNOCK-Gm.

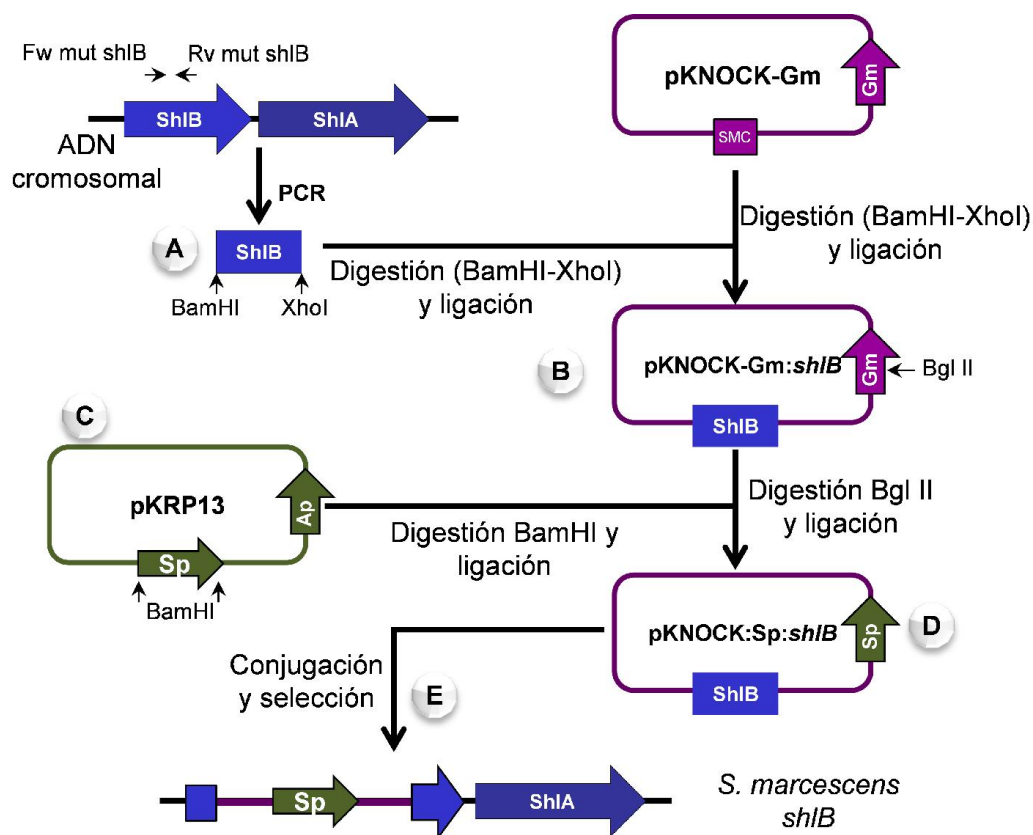


Figura 8. Estrategia utilizada para construir la mutante *S. marcescens* shIB. A) A partir del ADN cromosomal de *S. marcescens* se amplificó por PCR el gen *shIB*, se lo purificó y digirió con BamHI y XhoI. B) Posteriormente, dicho fragmento interno del gen *shIB* se clonó en el vector pKNOCK-Gm. C) A partir del plásmido pKRP13 se obtuvo por digestión con BamHI el gen de resistencia a espectinomicina y D) se ligó al plásmido pKNOCK-Gm:*shIB* previamente digerido con Bgl II. E) El gen *shIB* cromosomal fue interrumpido por recombinación, que genera la inserción del vector pKNOCK en *shIB*. SMC: Sitio de múltiple clonado.

Se electroporó la cepa *E. coli* SM10 (λ pir) con la ligación pKNOCK-Gm::*shIB*. La construcción pKNOCK-Gm::*shIB* fue confirmada por PCR a partir de colonias utilizando los cebadores pKNOCK-ori Fw y Rev mut ShIB (XhoI), que hibridan en el origen de replicación del vector pKNOCK-Gm y en el extremo 3' del fragmento interno de *shIB* (sección 4.1.4) y por digestión utilizando las endonucleasas BamHI y XhoI (sección 4.1.6). Posteriormente, y dada la incompatibilidad de la resistencia del vector con los ensayos de protección de gentamicina, el plásmido pKNOCK-Gm::*shIB* fue purificado y digerido con la enzima Bgl II, cuyo sitio de corte se encuentra dentro del casete de resistencia a gentamicina. El casete de resistencia a espectinomicina se obtuvo del plásmido pKRP13 (Reece & Phillips, 1995), mediante digestión con la enzima BamHI y posterior purificación en gel de agarosa (sección 4.1.6 y 4.1.7) y se ligó con el vector digerido. Finalmente, se transformó mediante electroporación la cepa

E. coli SM10 (λ pir) con la ligación pKNOCKSp::*shIB* y la construcción se confirmó mediante la adquisición de resistencia a espectinomicina y la pérdida de la resistencia a gentamicina.

Mediante conjugación bipartita en *S. marcescens*, dicho plásmido recombinó en el cromosoma de la bacteria interrumpiendo el gen *shIB* por inserción del vector completo. La cepa mutante fue seleccionada a partir de colonias resistentes a espectinomicina y la mutación cromosomal *shIB*::Sp fue confirmada por PCR, empleando los oligonucleótidos pKNOCK-ori-fw y Rev mut ShIB, según se indica en la sección 4.1.3.

5.2 - Construcción del plásmido *pshIBA*

Se realizó la extracción de ADN plasmídico de la cepa *E. coli* W3110/pES14 y de la cepa *E. coli* DH5 α /pBBR1MCS (sección 4.1.2). Ambos plásmidos fueron digeridos con las enzimas BamHI y HindIII (sección 4.1.6). Se purificó la banda correspondiente al inserto (tamaño aproximado 7500 pb) del corte de pES14 siguiendo los protocolos indicados en las secciones 4.1.4 y 4.1.5 y se precipitó el vector pBBR1MCS digerido. Luego se procedió a realizar la ligación de ambos fragmentos, según el protocolo detallado en la sección 4.1.7. Dicha ligación fue utilizada para transformar por electroporación células competentes *E. coli* XL-1 Blue (secciones 4.2 y 4.3). Las transformantes fueron seleccionadas mediante su resistencia a cloranfenicol. La construcción *pshIBA* fue confirmada por digestión utilizando las endonucleasas BamHI y HindIII (sección 4.1.6).

La cepa XL-1 Blue/*pshIBA* se utilizó como cepa dadora en la conjugación tripartita, donde la cepa *S. marcescens/shIB* se utilizó como cepa aceptora (sección 4.4). Las transconjugantes se analizaron mediante la adquisición de la resistencia a cloranfenicol y la recuperación de actividad hemolítica ante glóbulos rojos frescos (sección 7).

6 - Análisis de proteínas de *S. marcescens*

6.1 - Precipitación de proteínas secretadas

Tres mililitros de cultivo saturado de las cepas de *S. marcescens* o *E. coli*, crecidas en medio LB a 30°C, fueron centrifugados durante 10 min a 5000 rpm. Los sobrenadantes fueron filtrados con filtros de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,2

µm Minisart, Sartorius Stedim Biotech) y precipitados con 12% ácido tricloroacético, durante 2 horas a 4°C. La mezcla fue centrifugada 20 min a 15000 rpm y luego se realizó un lavado con 1 mL de acetona fría. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 60 µl de solución de siembra de proteínas (120 mM Tris pH 6,8; 0.5 % (v/v) β-mercaptoetanol, 2% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS y 0,002% (p/v) azul de bromofenol).

6.2 – Preparación de fracciones proteicas de *S. marcescens*

Cultivos saturados de las cepas de *S. marcescens* crecidas en medio LB a 30°C, fueron centrifugados durante 10 min a 5000 rpm. El sedimento fue resuspendido en un volumen igual a una $DO_{630}/10$ en solución de siembra de proteínas (120 mM Tris pH 6,8; 2% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS y 0,002% (p/v) azul de bromofenol) y constituye el extracto total de proteínas bacterianas.

Con el fin de obtener fracciones proteicas solubles e insolubles, el sedimento de cultivos saturados de las cepas de *S. marcescens* crecidas en medio LB a 30°C se resuspendió en 0,3 mL de 10 mM Tris pH 8, manteniéndolo en hielo. Luego, se procedió a una etapa de sonicación de 3 min, con intervalos de 9 s de ultrasonido y de 3 s de reposo. Se centrifugó por 5 min a 6000 rpm, recuperando el sobrenadante y descartando el sedimento celular. Dicho sobrenadante fue ulteriormente centrifugado por 40 min a 13000 rpm, obteniéndose un sobrenadante que se corresponde con la fracción de proteínas solubles. El sedimento se resuspendió en 1 mL de 10 mM Tris pH 8, y se volvió a centrifugar durante 15 min a 13000 rpm. El sedimento obtenido fue resuspendido en 0,3 mL de 10 mM Tris pH 8, constituyendo la fracción de proteínas insolubles. Todas las fracciones proteicas fueron almacenadas a -20°C.

6.3 - Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Antes de la siembra las muestras se calentaron 5 minutos a 100 °C en solución de muestra conteniendo 120 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 % (v/v) β-mercaptoetanol, 2 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS y 0.002% (p/v) azul de bromofenol. Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución reguladora 25 mM Tris base, 192 mM glicina (pH 8.3) y 0.1 % (p/v) SDS, a una intensidad de corriente constante de 25 mA. La concentración de poliacrilamida utilizada en los geles de separación fue de 10 % (p/v).

6.4 – Tinción de gel con azul de Coomassie

Luego de la separación proteica por electroforesis como es indicado en la sección 6.3, se incubaron los geles durante al menos 1 hora con agitación constante en una solución de 0.25 % (p/v) azul brillante de Coomassie R 250, 30 % (v/v) isopropanol y 10 % (v/v) ácido acético, previamente filtrada a través de un papel de filtro Whatman No. 1. Se incubaron y se hicieron lavados sucesivos de los geles con agua caliente, hasta lograr que el fondo fuera claro.

6.5 - Transferencia e inmunodetección (Western blot)

Las muestras proteicas fueron sometidas a SDS-PAGE (sección 6.3) y luego fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (General Electric Healthcare) en una cuba de transferencia semi seca Trans-blot SD (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en solución 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8,3 y 10% (v/v) metanol, durante 30 min con una intensidad de corriente constante de 300 mA. Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue lavada durante 1 hora con solución TBS (20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl) conteniendo 5% leche en polvo descremada. Posteriormente, se incubó la membrana por 1 hora con el anticuerpo primario en una dilución adecuada en solución TBS y, al cabo de esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 min con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora con anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) o a peroxidasa de rabanita (Sigma) en una dilución 1/3500 en TBS. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS. El revelado se llevó a cabo incubando la membrana con 3 ml de la solución 100 mM Tris pH 9,0; 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ conteniendo 0,15 mg/ml BCIP y 0,3 mg/ml NBT disueltos en 70% de N-N-dimetilformamida, hasta desarrollo de color. Los componentes NBT y BCIP reaccionan con la fosfatasa alcalina produciendo un precipitado insoluble color púrpura. En el caso de incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanita, las membranas fueron reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia con ECL Plus (GE HealthCare), según las indicaciones del fabricante y las imágenes fueron tomadas con un capturador de imágenes Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) y el programa QuantityOne.

7 - Ensayos de hemólisis en medio líquido

Muestras de sangre fueron lavadas repetidas veces con PBS (del inglés **Phosphate Buffered Saline**; 8,5 g/L de NaCl, 1,4 g/L de NaH₂PO₄·H₂O y 2,7 g/L de

Na₂HPO₄·7 H₂O), hasta obtener eritrocitos limpios. 200 µL de eritrocitos se incubaron durante 1 hora a 30°C sin agitación con 200 µL de cultivos de *S. marcescens* crecidos durante 16 horas a 30°C sin agitación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se incubaron los eritrocitos con agua destilada o con LB como controles de hemólisis completa y blanco de muestra, respectivamente. Luego de dicha incubación, se centrifugaron los cultivos durante 5 minutos a 6500 rpm y se tomó una muestra de 200 µL del sobrenadante de la reacción, al cual se le midió la absorbancia a 562 nm (DO₅₆₂). Además se midió la densidad óptica a 630 nm (DO₆₃₀) a 200 µL de cada cultivo. Las medidas de absorbancia se realizaron usando un lector de microplacas Biotek ELX-808.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calculó el porcentaje de hemólisis, considerando que el agua produce una hemólisis del 100%. Luego, los valores obtenidos fueron relativizados a la DO₆₃₀ de cada cultivo. El índice de cambio para cada cepa fue calculado como la relación entre el porcentaje de hemólisis relativo a la densidad óptica del cultivo de la cepa en cuestión y el de *S. marcescens* silvestre.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{DO_{562} \text{ Cepa}}{DO_{562} \text{ Agua}} \times 100$$

$$\text{Índice de cambio} = \frac{\frac{\% \text{ Hemólisis}}{DO_{630}} \text{ Cepa}}{\frac{\% \text{ Hemólisis}}{DO_{630}} \text{ Cepa de referencia}}$$

8 - Curvas de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron en medio LB y se monitorearon en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy2, durante un período de 18 hs con control de temperatura (37°C). Cultivos bacterianos crecidos hasta saturación fueron diluidos 1:100 en medio LB sólo o suplementado con 100 nM wortmanina, 100 nM Bafilomicina A1 o 10 mM NH₄Cl, según se indica en los ensayos respectivos. Un volumen de 100 µl de cada dilución se colocó en una microplaca de 96 pocillos, se incubó a 37°C en el lector de microplacas, y se determinó la absorbancia a 630nm cada 60 min.

9 - Técnicas de cultivos celulares

9.1 - Ensayos de invasión o protección a la gentamicina

Los ensayos de protección con gentamicina fueron realizados según describe en Fedrigo y colaboradores (Fedrigo *et al.*, 2011). Células CHO, HeLA, T24 o MEF fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo utilizado fue α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Cultivos de *S. marcescens* saturados, crecidos a 30°C sin agitación, se centrifugaron 5 min a 6500 rpm y el sedimento celular se lavó y resuspendió con PBS. Las células se infectaron con los cultivos bacterianos, utilizando MOIs (MOI, del inglés **M**ultiplicity **o**f **i**nfection) entre 2 y 10. La placa se centrifugó 10 min a 1000 rpm y se incubó 1 hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio de cultivo suplementado con 30 μ g/ml de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. La placa se incubó a 37°C y, a los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 0,05% Tritón X-100. Las UFC (Unidades formadoras de colonia) se determinaron mediante diluciones seriadas en medio LB-agar. Los porcentajes de invasión se calcularon en relación al inóculo bacteriano inicial utilizado para la infección de las células.

9.2 - Ensayos de autofagia

Para evaluar la capacidad de inducir autofagia de diferentes cepas bacterianas, células CHO-GFP-LC3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar 70% de confluencia. Cultivos de *S. marcescens* saturados, crecidos sin agitación a 30°C, se centrifugaron 5 min a 6500 rpm y el pellet celular se lavó y resuspendió con PBS. Las células se infectaron con los cultivos bacterianos, utilizando MOI 20; y la placa se centrifugó 10 min a 1000 rpm. Luego, en una serie de experimentos las células se mantuvieron con bacterias en el medio extracelular durante 180 min o, a los 60 min p.i., las bacterias extracelulares se eliminaron con 30 μ g/mL gentamicina. Finalmente a los tiempos indicados, las células se fijaron con 3% paraformaldehído durante 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta, como se indica en la sección 9.6. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia confocal y los porcentajes de invasión y colocalización de la bacteria con GFP-LC3 se calcularon en relación a las células totales cuantificadas o a las células invadidas según se indique en cada caso.

9.3 - Transfección de células epiteliales

Células HeLa, T24, MEF Atg5^{+/+} y MEF Atg5^{-/-} crecidas a 50% de confluencia en monocapa fueron transfectadas con el plásmido pRFP:LC3 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante. Posteriormente para permitir la expresión de estas construcciones, las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Luego las células se dejaron sin infectar o fueron infectadas con *S. marcescens* salvaje/pGFP (MOI 20) en atmósfera de CO₂ al 5%. A los 180 min p.i. las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 3% paraformaldehído por 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta. Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia confocal (sección 9.5).

9.4 - Marcación de compartimentos degradativos durante la infección con *S. marcescens*

Células CHO-EGFP-LC3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar 70% de confluencia. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 4 h con 10 µg/ml DQ-BSA. Este compuesto ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor y fluoresce en compartimentos degradativos, como ser autolisosomas y lisosomas. Luego, las células fueron infectadas con *S. marcescens* salvaje (MOI 20) durante 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio de cultivo suplementado con 30 µg/ml gentamicina. A los 240 y 360 min. p.i., las células se fijaron con 3% paraformaldehído por 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta. Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia confocal (sección 9.7). Los porcentajes de colocalización se calcularon en relación al número de vacuolas total infectadas recontadas.

9.5 - Marcación de compartimentos ácidos durante la infección con *S. marcescens*

Células CHO-GFP-LC3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar 70% de confluencia. Posteriormente, las células fueron infectadas con *S. marcescens* salvaje (MOI 20) durante 1 h a 37°C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio de cultivo suplementado con 30 µg/ml gentamicina y 3 µM de LysoTracker. LysoTracker es un compuesto acidotrópico fluorescente que permea libremente a la célula eucariota y

fluoresce en compartimentos ácidos. Finalmente a los 240 y 360 min p.i., las células se fijaron con 3% paraformaldehído por 15 min y las bacterias se detectaron por inmunofluorescencia indirecta (sección 9.6). Los porcentajes de colocación se calcularon en relación al número de vacuolas total infectadas recontadas.

9.6 - Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Células epiteliales invadidas con *S. marcescens* fueron fijadas con 500 µl de 3% paraformaldehído durante 15 min y permeabilizadas con 0,1% de Tritón X-100. Subsecuentemente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas 1 h con el anticuerpo primario policlonal anti-*Serratia* (dilución 1/500) a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS y las células fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpos secundarios anti-conejo diluidos, 1/150 para anticuerpo conjugado a Cy3 o 1/300 para anticuerpo conjugado a Alexa Fluor 647. Las células fueron sometidas a 3 lavados de 10 min cada uno con PBS y montadas con el reactivo Slow Fade Antifade en glicerol/PBS (Molecular Probes, Invitrogen). Finalmente, las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 (Nikon, Japón) o en el microscopio confocal Olympus FluoView TM FV1000 (Olympus, Argentina), utilizando los programas EZ-C1 o FV10-ASW, respectivamente.

9.7 - Marcación de bacterias citoplasmáticas e intravacuolares mediante permeabilización diferencial de la célula epitelial

Células CHO-GFP-LC3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar 70% de confluencia. Posteriormente, las células fueron infectadas con *S. marcescens* salvaje (MOI 20) durante 1 h a 37°C. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio de cultivo suplementado con 30 µg/ml gentamicina. A los 120 y 360 min p.i. la membrana plasmática de las células se permeabiliza con 500 µL de digitonina 25 µg/ml durante 60 segundos. Digitonina es un detergente glicósido no-iónico que permeabiliza selectivamente la membrana plasmática debido a que la misma posee una mayor concentración de colesterol comparada con las membranas intracelulares. Luego, las células son incubadas durante 30 minutos con anticuerpo anti-*Serratia* en una dilución 1/250 en medio α-MEM a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lavan 3 veces con PBS y se fijan con 3% paraformaldehído durante 15 minutos. Para lograr una permeabilización total de las membranas de las células

eucariotas, se utilizó saponina 0,01% durante 10 minutos. Saponina es capaz de permeabilizar tanto la membrana plasmática como las membranas intracelulares (Eckhardt, Gotza, & Gerardy-schahn, 1999, Knodler et al., 2010). Luego, se incuban las células con anticuerpo secundario conjugado a Alexa 647 durante 1 hora, se realizan 3 lavados con PBS y se realiza una segunda incubación con anti-*Serratia*. Se realizan lavados con PBS y finalmente, las células se incuban con anticuerpo secundario conjugado a Cy3. De esta manera, las bacterias presentes en citoplasma presentan la marca de los 2 fluoróforos, mientras que las bacterias intravacuolares solo poseen fluorescencia roja. Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia.

9.8 – Medición de actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Células CHO en cultivo fueron invadidas con *S. marcescens* silvestre y la cepa mutante *shIB* como fue descrito en la sección 9.1. A los 240 min p.i. se eliminó la gentamicina de la mitad de los pocillos invadidos. A los 360 min p.i se retiraron alícuotas del sobrenadante de cada uno de los pocillos, y luego las células epiteliales se lisaron con 500 µl de PBS-Tritón 0,1%. Se conservaron también alícuotas de este lisado.

Para determinar el daño celular, se midió la actividad LDH del sobrenadante y del lisado. Se utilizó un kit comercial (Laboratorios Wiener S.A.) basado en una reacción colorimétrica, siguiendo las especificaciones del fabricante. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como:

$$\text{Citotoxicidad [\%]} = [\text{LDH}_{\text{sobrenadante}} / (\text{LDH}_{\text{sobrenadante}} + \text{LDH}_{\text{lisado}})] * 100$$

Se utilizó como control negativo del ensayo una monocapa de células sin invadir y como control positivo células invadidas con *S. marcescens* silvestre, donde las bacterias extracelulares no fueron eliminadas mediante la acción de gentamicina.

10 – *Drosophila melanogaster*

10.1 – Cepas de insectos

Las moscas se crecen en el medio convencional corneal-agar a 25 °C. Las moscas silvestres se denominan A5001, y sobre su entorno génico se realizaron las mutantes utilizadas en estas series de experimentos. Las mutantes *kenny* son

deficientes en la vía IMD y por lo tanto son incapaces de disparar esta vía del sistema inmune (Nehme *et al.*, 2007).

10.2 - Infección mediante Herida Séptica

Grupos de 20 moscas hembras silvestres son infectadas a través de la punción con una aguja previamente embebida en una solución adecuada de bacterias. Los cultivos de *S. marcescens* silvestre o cepas mutantes crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación constante son diluidos en LB hasta una DO_{630} de 0.1. Esto lleva a la inoculación de 50-100 bacterias por mosca. Los viales conteniendo las moscas invadidas se colocan en un incubador a 25 °C y las moscas sobrevivientes se cuentan cada pocas horas. Cada experimento mostrado es representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

10.3 - Infección mediante vía oral

Grupos de 20 insectos hembras adultos silvestres o mutantes se utilizaron para estos experimentos. La solución de infección se preparó a partir de bacterias crecidas en LB a 37 °C durante la noche. El cultivo es diluido o concentrado, según sea necesario, en LB fresco, antes de finalmente diluirlo 10 veces en una solución de sacarosa 50 mM para obtener una DO_{630} de 1. La solución de infección (2,5 ml) se utiliza para embeber los filtros colocados en el fondo de los viales de cultivos antes de agregar 20 ejemplares. Todos los ensayos de sobrevida fueron realizados a 25 °C y los insectos fueron alimentados diariamente con 200 µl de una solución estéril de sacarosa 100 mM. La sobrevida se monitoreó una vez al día y los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado según se indique en cada caso. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando la prueba de Log Rank dentro del software Prism.

10.4 – Inyección de partículas de látex

69 nL de partículas de látex CML rojas libres de surfactantes (partículas de poliestireno de 0,30 µm de diámetro) se inyectan en los insectos receptores para bloquear la fagocitosis, como se describió previamente (Rutschmann *et al.*, 2002).

Capítulo I: Caracterización de los procesos de invasión y replicación de *S. marcescens* en células epiteliales

INTRODUCCIÓN

Serratia marcescens es patógeno oportunista responsable de múltiples infecciones. Esta enterobacteria es frecuentemente identificada como agente responsable de brotes nosocomiales y la incidencia de infecciones de *S. marcescens* se ha visto incrementada en los últimos años. Sin embargo, el análisis de mecanismos y factores de virulencia involucrados en la colonización, invasión y diseminación, que son fundamento de la interacción bacteria-hospedador a largo plazo, y la identificación de nuevos blancos para generar terapéuticas alternativas, han permanecido relegados.

Actualmente, existen escasos reportes que ahondan los mecanismos de patogénesis de *S. marcescens*. Hertle y Schwartz demostraron que *S. marcescens* es capaz de invadir diferentes células epiteliales y causar vacuolización y lisis celular en las mismas (Hertle & Schwarz, 2004). Nehme y colaboradores encontraron que *S. marcescens* invade las células epiteliales del intestino medio de *Drosophila melanogaster*, al atravesar el intestino para llegar al interior del insecto (Nehme *et al.*, 2007). En otro trabajo, se ha demostrado que *S. marcescens* invade *Caenorhabditis elegans* y luego de colonizar el intestino del nematodo, la bacteria causa la muerte del mismo. Además un análisis realizado en *C. elegans*, *D. melanogaster* y células epiteliales en cultivo demostró la capacidad patogénica de esta bacteria en un amplio rango de hospedadores (Kurz *et al.*, 2003).

Durante el desarrollo de su tesis doctoral, la Dra. Fedrigo determinó que el aislamiento clínico de *Serratia marcescens* RM66262 es capaz de sobrevivir y replicarse de forma exponencial en células CHO. *S. marcescens* ingresa a la célula mediante endocitosis, colocaliza con los marcadores Rab7 y LC3, característicos de autofagosomas y la vacuola que la contiene (“vacuola que contienen a *Serratia*” o SeCV) no adquiere características degradativas (Fedrigo *et al.*, 2011).

Conociendo estos antecedentes, en este capítulo de la tesis se propone profundizar la caracterización del tráfico intracelular que realiza este patógeno en la célula hospedadora, como así también, dilucidar cuales son las estrategias que despliega para sobrevivir en la célula infectada.

RESULTADOS

1 - Mecanismo de Invasión y Replicación de *S. marcescens* en distintas líneas celulares

Con el fin de determinar si los mecanismos de invasión y replicación de *S. marcescens* en las células CHO puede reproducirse en otras líneas celulares se realizaron ensayos de protección de gentamicina utilizando las líneas celulares epiteliales inmortalizadas HeLa (derivadas de cáncer cervical humano, (Mestre *et al.*, 2010) y T24 (línea celular epiteliales de vejiga humana, (Eiján *et al.*, 2003)) y la línea de fibroblastos MEF (fibroblastos embrionarios murinos, (Mizushima *et al.*, 2001)). Se infectaron las distintas líneas celulares y luego de 60 min p.i. se suplementó el medio con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Durante estos ensayos se utilizó una MOI de 2 ya que algunas de las líneas celulares empleadas presentaron una mayor susceptibilidad a los efectos citotóxicos de *S. marcescens* cuando se las exponía a un número mayor de bacterias. Finalmente, se contaron las UFC a distintos tiempos (sección 9.1 de Materiales y Métodos). Como se muestra en los resultados graficados en la figura 9 A, *S. marcescens* es capaz de ingresar y replicar dentro de todas las líneas celulares utilizadas hasta los 240 min p.i., manteniendo un número constante de UFC intracelulares hasta los 360 min p.i. Este resultado demuestra que los fenotipos de invasión hallados con las células CHO no están restringidos a la interacción de *S. marcescens* con un tipo celular determinado.

Con el objeto de determinar si el disparo de autofagia estaba involucrado en el mecanismo de invasión de *S. marcescens* a estas líneas celulares, se realizó una transfección con un plásmido que codifica para la expresión transiente de la proteína de fusión ERFP-LC3 (sección 9.3 Materiales y Métodos). Como se describió en la Introducción general, LC3 es una proteína asociada a microtúbulos considerada el principal marcador específico de autofagosomas, dado que durante la maduración de estos compartimentos la forma citosólica de esta proteína (LC3-I) sufre un procesamiento proteolítico C-terminal y se conjuga con fosfoetanolamina (LC3-II) quedando retenida en las membranas de los autofagosomas nacientes (Kabeya *et al.*, 2000; Münz, 2009). Por ello, la inducción de un proceso autofágico en células en cultivo expresando un reportero fluorescente de la proteína LC3 se puede monitorear mediante una distribución citoplásmica no homogénea, correspondiente a la interacción LC3-membranas de los autofagosomas como contrapartida de la presentación homogénea de reposo celular. Mediante la observación microscópica del

patrón punteado de LC3 se pudo demostrar que la inducción de la autofagia en respuesta a *S.marcescens* no se limita a las células CHO (Figura 9 B).

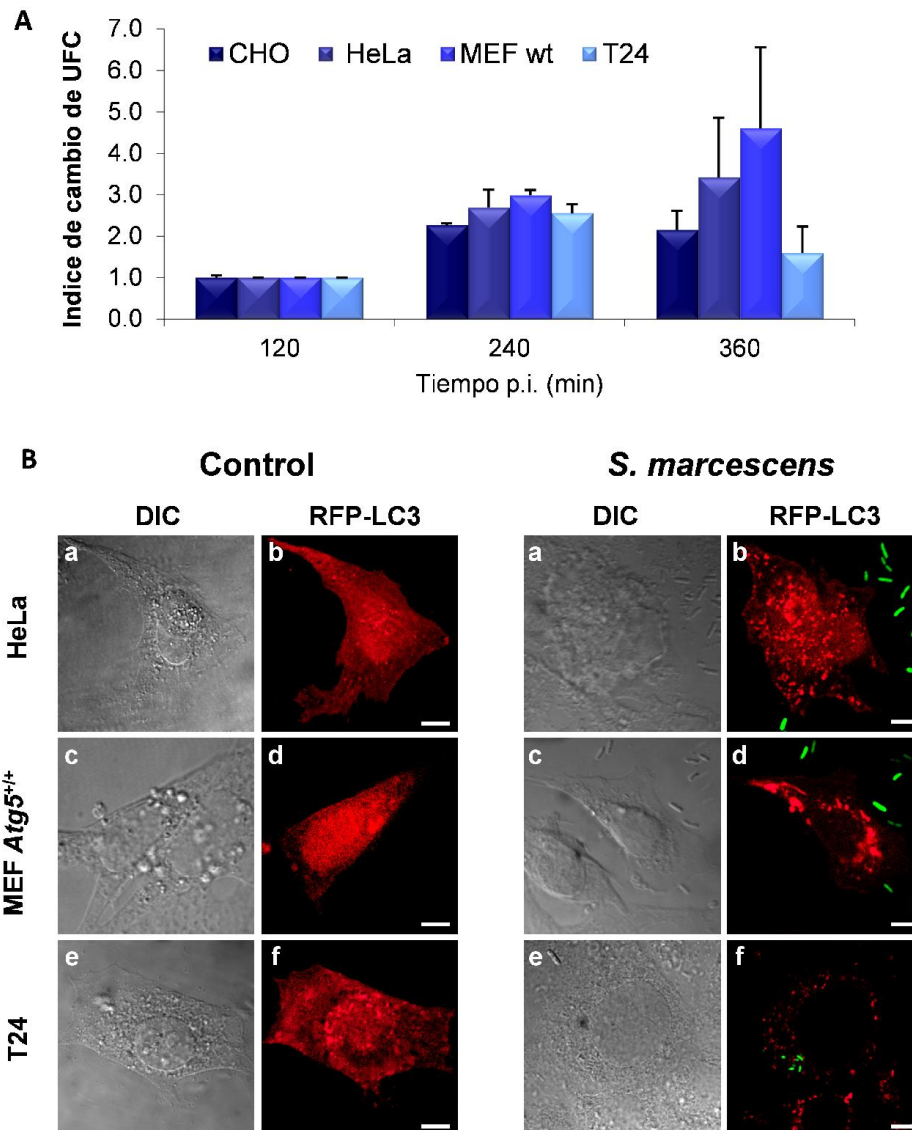


Figura 9. *S. marcescens* es capaz de invadir e inducir autofagia en distintos tipo celulares. A) Se infectaron células CHO, HeLa, MEF *Atg5*^{+/-} y T24 con *S. marcescens* silvestre durante 60 min y las bacterias extracelulares se eliminaron con gentamicina. A los tiempos indicados, se lavaron las células con PBS y se lisaron con Tritón X-100 0,05%. Las UFC se determinaron en placas de LB, los cambios en las UFC se calcularon en relación a los valores obtenidos a los 120 min p.i. B) Se transfectaron de manera transiente células HeLa, MEF *Atg5*^{+/-}, y T24 con RFP-LC3 (fluorescencia roja) y se invadieron con *S. marcescens*/pGFP silvestre (fluorescencia verde) o se dejaron sin invadir (Control). Las células se fijaron a los 180 min p.i. y se visualizaron mediante microscopia confocal. Barra: 10 μ m.

2 - Caracterización del compartimento intracelular que contiene a *S. marcescens*

Anteriormente se demostró que luego de su ingreso a la célula epitelial una población mayoritaria de *S. marcescens* se aloja en un compartimento intracelular, SeCV que, tempranamente, recluta marcadores prototípicos del proceso autofágico (Rab7 y LC3) (Fedrigo *et al.*, 2011). Como se describió en la introducción general, durante el proceso de maduración, las vacuolas autofágicas se fusionan con compartimentos de la vía endo/lisosomal, lo que conlleva a una acidificación de la vacuola y a la adquisición de enzimas hidrolíticas con capacidad degradativa (Xie & Klionsky, 2007). Con el fin de determinar si este es el destino de las SeCV, se realizaron ensayos de colocalización de células CHO-EGFP-LC3 invadidas con *S. marcescens* con el marcador acidotrópico LysoTracker y con el marcador de compartimentos degradativos DQ-BSA. LysoTracker es un marcador fluorescente acidotrópico que ingresa por permeabilización a la célula eucariota y fluoresce en lisosomas y autolisosomas (Invitrogen and Molecular Probes., 2007). DQ-BSA es un compuesto fluorescente constituido por albúmina sérica bovina conjugado a un fluoróforo apagado. Cuando la albúmina sérica bovina es degradada por proteólisis, el fluoróforo se libera de la molécula proteica y fluoresce. Este compuesto ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor y es resistente a pH ácidos y básicos (Molecular Probes and Invitrogen., 2001).

Con el objeto de evaluar el carácter ácido de los autofagosomas que contienen a *S. marcescens* se infectaron células CHO-GFP-LC3 con *S. marcescens* y, luego de 60 min p.i., se incubaron las células con LysoTracker (sección 9.6 de Materiales y métodos). Para evaluar el carácter degradativo de estas vacuolas, se precargaron células CHO-GFP-LC3 con DQ-BSA durante 4 h y luego se infectaron con *S. marcescens* (sección 9.5 de Materiales y métodos).

En la figura 10 se muestran imágenes de células infectadas con *S. marcescens* a los 360 min p.i. y en ella se detectan grandes compartimentos decorados con EGFP-LC3 que contienen a las bacterias intracelulares y no están marcados con LysoTracker (Figura 10 C) o con DQ-BSA (Figura 10 D), como así también, compartimentos conteniendo a las bacterias que no presentan decoración con EGFP-LC3 y están marcados con LysoTracker (Figura 10 C, flecha) o con DQ-BSA (Figura 10 D, flecha). No se observan vacuolas que colocalicen con LC3 y LysoTracker (o DQ-BSA) simultáneamente.

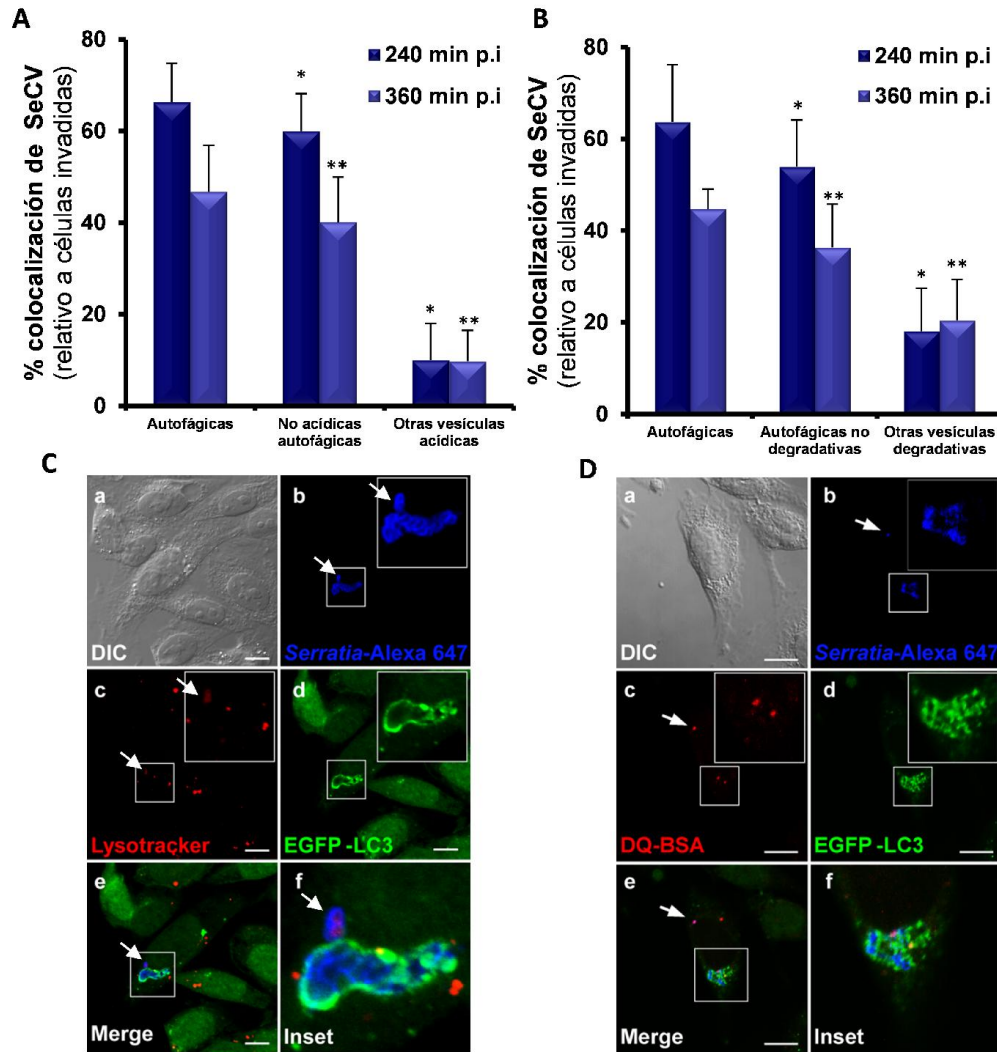


Figura 10. Las SeCV son mayoritariamente compartimentos no-ácidos y no degradativos. A) Células CHO-EGFP-LC3 fueron infectadas con *S. marcescens* silvestre. Luego de 60 min p.i. se incubó a las células con Lysotracker 3 μ M para marcar los compartimentos ácidos. Las células se fijaron a los 240 o 360 min p.i. y las bacterias intracelulares se marcaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 647. El porcentaje de colocalización con EGFP-LC3 y/o con Lysotracker se determinó por microscopía de fluorescencia. Se contaron al menos 300 células infectadas para cada condición. Se muestra el promedio y desvío estándar de 2 experimentos independientes, * y ** $p < 0,001$. **B)** Células CHO-EGFP-LC3 se incubaron durante 4 horas con 10 mg/ml DQ-BSA, y se invadieron con *S. marcescens* silvestre. Las células se fijaron a los 240 o 360 min p.i. y las bacterias intracelulares se marcaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpo secundario conjugados a Alexa Fluor 647. El porcentaje de colocalización con EGFP-LC3 y/o con Lysotracker se determinó por microscopía de fluorescencia. Se contaron al menos 300 células infectadas para cada condición. Se muestra el promedio y desvío estándar de 2 experimentos independientes, * y ** $p < 0,001$. **C)** Imágenes representativas de células CHO-EGFP-LC3 (fluorescencia verde, d) infectadas con *S. marcescens* (fluorescencia azul, b) incubadas con Lysotracker (fluorescencia roja, c) durante 360 min. La imagen del recuadro (f) muestra una mayor magnificación de la imagen remarcada en la imagen fusionada, y muestra una SeCV autofágica no ácida. Las flechas muestran vesículas ácidas. Barra: 10 μ m. **D)** Imágenes representativas de células CHO-EGFP-LC3 (fluorescencia verde, d), pre-incubadas con DQ-BSA (fluorescencia roja, c) e infectadas con *S. marcescens* (fluorescencia azul, b) durante 360 min. La imagen del recuadro (f) muestra una mayor magnificación de la imagen remarcada en la imagen fusionada, y muestra una SeCV autofágica no degradativa. Las flechas muestran vesículas degradativas. Barra: 10 μ m.

Cuando se cuantificaron los compartimentos conteniendo *S. marcescens* marcados o no marcados con LysoTracker a los 240 min p.i. (Figura 10 A) se pudo estimar la colocación de SeCV con LC3 en un 66.2%. El 60% de las vacuolas colocaliza con LC3 pero no lo hace con LysoTracker, indicando que son compartimentos autofágicos no ácidos. Alrededor del 10% de las SeCV se encuentran marcadas con LysoTracker pero no presentan localización con LC3. La cuantificación de los compartimentos conteniendo *S. marcescens* marcados o no marcados con DQ-BSA (Figura 10 B), presentó un estimado de 66,6% de SeCV que colocalizan con LC3 a los 240 min p.i. El 53,9% de las SeCV están marcadas con LC3 pero no muestran colocación con DQ-BSA, mientras que el 18,1% de las SeCV están marcadas con éste marcador de compartimentos degradativos pero no con LC3.

Una distribución similar de vesículas se determinó a los 360 min p.i. (Figura 10 A y 9 B). Estas observaciones permiten inferir que una población mayoritaria de las bacterias intracelulares está escapando al sistema ácido y degradativo celular; mientras que otra población minoritaria es eficazmente degradada por el sistema de defensa de la célula. Esto indica que *S. marcescens* es capaz de bloquear o retrasar la fusión con compartimentos lisosomales que, fisiológicamente, resultan en la formación del autofagosoma destinado a la eliminación del agente invasor.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se efectuaron ensayos de invasión en presencia de Bafilomicina A1 100 nM o NH_4Cl 10 mM desde el momento de la infección para bloquear la acción de la H^+ -ATPasa vacuolar o neutralizar la acidificación vacuolar respectivamente (sección 9.1 de Materiales y Métodos). A diferencia del resultado esperado, que predeciría un aumento en las UFC intracelulares debido al bloqueo de la acidificación de la SeCV, las UFC (Figura11) se vieron drásticamente disminuidas desde los 120 min p.i. (0,91% y 2,71% para células tratadas con bafilomicina A1 y NH_4Cl versus 8,26% para las células control) y no tuvieron cambios significativos durante el resto del ensayo al ser comparadas con las células no tratadas.

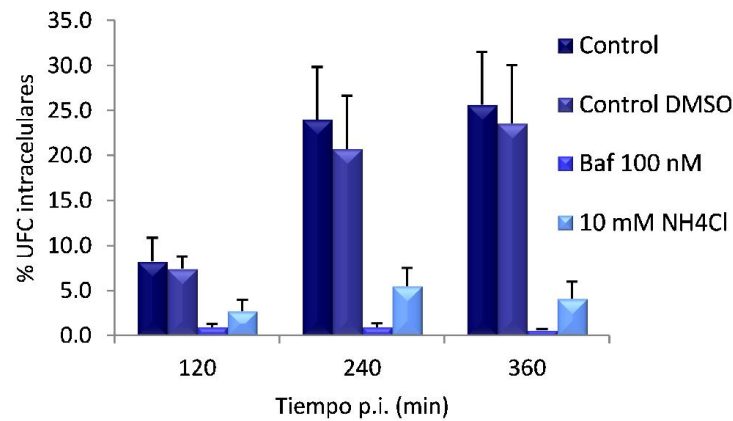


Figura 11. Efecto de la inhibición o neutralización de la acidificación en la invasión de *S. marcescens*. Células CHO-EGFP-LC3 se mantuvieron en α -MEM, fueron tratadas con DMSO 1%, bafilomicina A1 100 nM o NH₄Cl 10 mM. Luego fueron invadidas con *S. marcescens* silvestre y se realizó un ensayo de protección de gentamicina. A los 120, 240 y 360 min p.i. se lisaron las células con Tritón X-100 0,05% y se determinaron las UFC en placas de LB. El porcentaje de UFC intracelulares se calculó con respecto al inóculo inicial.

Posteriormente, se examinó la inducción de la autofagia mediante el análisis de la conversión de la isoforma de LC3-I a la isoforma LC3-II lipidada y procesada. De esta manera se comparará el valor del índice LC3-II/LC3-I para las células control, 0,06, con el valor de las células invadidas, 0,44, que es similar al de las células sometidas a hambreado, 0,44 (Figura 12). Al determinar la conversión LC3-I a LC3-II, en presencia de los inhibidores en células control se detectó la acumulación de LC3-II en concordancia con la acción esperada de ambos inhibidores, de bloquear la fusión del autofagosoma con el lisosoma y prevenir el reciclado de LC3-II (Figura 12, índice LC3-II/LC3-I = 0,71 para NH₄Cl y = 0,52 para Bafilomicina comparado con el valor de 0,06 en las células control no tratadas). Sin embargo, cuando se realizó el ensayo de invasión en presencia de Bafilomicina A1 o NH₄Cl, los índices LC3-II/LC3-I fueron similares a los obtenidos en las células no invadidas.

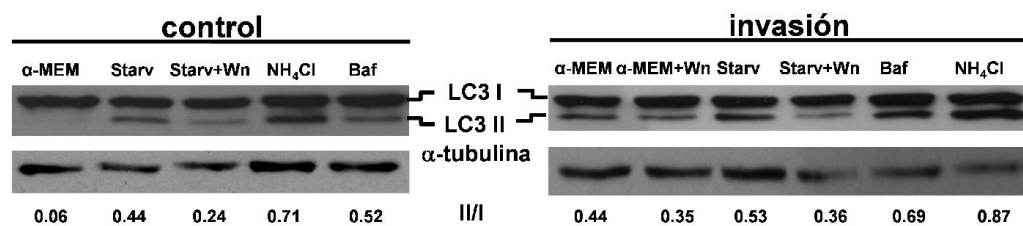


Figura 12. Análisis de la conversión LC3-I/LC3-II. Monocapas de células CHO-GFP-LC3 sujetas al ensayo de invasión descrito en la figura 3 o a un pre-tratamiento de 2 hs con medio de hambreado (starv) o con wortmanina (Wn) fueron resuspendidas en solución de siembra. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos policlonales anti-GFP (Invasión, paneles a la derecha). Las células control no invadidas sujetas a los mismos tratamientos también fueron analizadas (Control, paneles a la izquierda). Se indica la posición de las bandas correspondientes a LC3-I y LC3-II. La carga de proteínas se chequeó con respecto al contenido de α -tubulina. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. El índice LC3-II/LC3-I se calculó para el experimento mostrado (II/I).

En la figura 13 se muestran imágenes de células invadidas o no invadidas con *S. marcescens* tratadas con Bafilomicina A1 o NH_4Cl . El patrón punteado de LC3 que se puede observar en las células no invadidas y tratadas con los inhibidores demuestra el bloqueo efectivo del reciclado de LC3. Se pueden encontrar unas pocas SeCV con un bajo número de bacterias en las células tratadas e invadidas, lo que se correlaciona con los reducidos niveles de UFC recuperados. Estos resultados permiten interpretar los valores similares obtenidos en el índice de conversión de LC3 entre células invadidas y no invadidas tratadas con los inhibidores. Dado que ambos compuestos inhiben eventos tempranos en la interacción de *S. marcescens* con la célula hospedadora y la acción de la gentamicina elimina rápidamente las bacterias extracelulares, se impide el desarrollo de la inducción extracelular de autofagia.

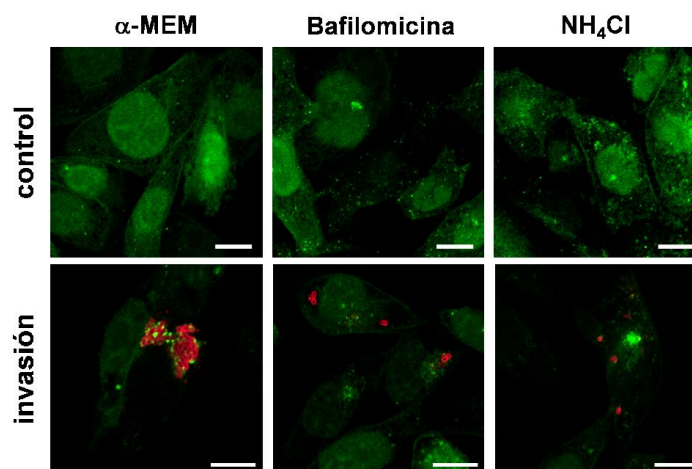


Figura 13. Análisis de la alteración de la acidificación vacuolar en la invasión de *S. marcescens* mediante microscopía confocal. Células CHO-EGFP-LC3 sometidas a un ensayo de invasión como el descrito en la figura 9 se visualizaron mediante microscopía confocal. Las imágenes control e invasión muestran células no invadidas o invadidas con *S. marcescens* respectivamente, incubadas con $\alpha\text{-MEM}$, $\alpha\text{-MEM}$ + Bafilomicina A1 100 nM o $\alpha\text{-MEM}$ + NH_4Cl 10 mM. Las células se fijaron a los 360 min p.i. y las bacterias se detectaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3. Se muestran imágenes representativas de dos experimentos independientes, donde se analizaron al menos 300 células por condición. Barra: 10 μm .

Los resultados anteriores podrían deberse a algún tipo de efecto tóxico sobre las bacterias, que de alguna manera inhibieran su capacidad invasiva y replicativa o fuera deletéreo para las mismas. Sin embargo, no se observaron efectos tóxicos sobre el crecimiento de la bacteria cuando los inhibidores se adicionaron al medio de cultivo (Figura 14). Dado que los dos procedimientos que se utilizaron para evitar la acidificación intravacuolar provocaron una severa disminución en las UFC recuperadas desde los tiempos tempranos del proceso de invasión, se podría especular que se requiere un ambiente con bajo pH para la acción de uno o más factores bacterianos involucrados en el mecanismo de internalización de *Serratia*.

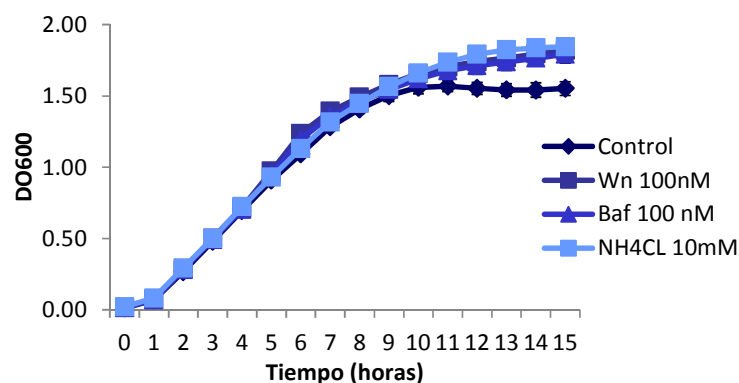


Figura 14. Efecto de los inhibidores de la acidificación vacuolar sobre el crecimiento de *S. marcescens*. Un cultivo de *S. marcescens* de 16 hs a 37 °C con agitación se diluyó 1/100 en LB (Control), LB + Wortmaina 100 nM (Wn 100nM), LB + Baflomicina A1 (Baf 100 nM) y LB + NH₄Cl 10 mM (NH₄Cl 10 mM). Se midió la DO600 cada 1 hora durante 15 horas para monitorear el crecimiento. Se muestra el promedio y las desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3 - Caracterización del proceso autofágico disparado por *S. marcescens*

A la luz de los resultados previos y para analizar si la inducción del proceso autofágico es requerido y/o aumenta la eficiencia del proceso infectivo, se realizó el ensayo de invasión celular habiendo inducido previamente autofagia por hambreado aminoacídico celular, mediante la incubación de 2 horas previas a la infección en medio EBSS, o bien efectuando la invasión en presencia del inhibidor wortmanina (Wn), mediante una pre-incubación de 2 horas y el mantenimiento de la acción inhibitora durante todo el ensayo. Cuando se indujo autofagia por hambreado de las células no se observó un aumento en las UFC intracelulares comparado con las células no tratadas a ninguno de los tiempos analizados (Figura 15). Por el otro lado, cuando se utilizó Wn para bloquear la autofagia, las UFC intracelulares disminuyeron drásticamente al compararlas con las células no tratadas. La inspección microscópica de las células reveló que cuando se utilizó Wn, los escasos compartimentos intracelulares que contenían a *S. marcescens* estaban decorados con LC3 y exhibían un fenotipo muy similar a las SeCV de las células no tratadas (Figura 16). Estos resultados indican que el tratamiento con el inhibidor disminuyó el proceso de invasión aunque no fue capaz de evitar la inducción del proceso de autofagia disparado por *Serratia* ni, en las pocas células invadidas, la formación de grandes SeCV decoradas con LC3 y, por lo tanto, no alteraría la replicación bacteriana intracelular.

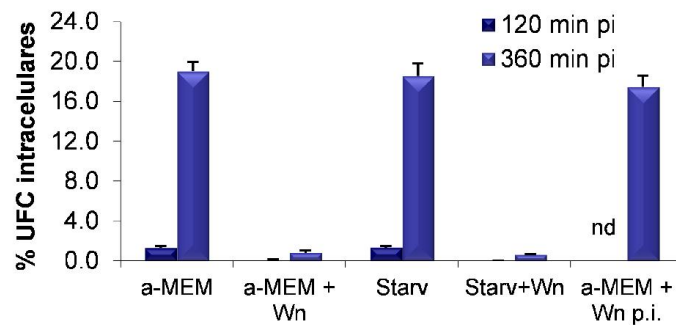


Figura 15. Modulación del proceso de autofagia durante la invasión de *S. marcescens*. Células CHO-EGFP-LC3 se mantuvieron en α -MEM, o se pre-trataron en medio de hambre (Starv). Se adicionó wortmanina 100 nM (Wn) 2 hs previo al ensayo de invasión (α -MEM + Wn; o Starv + Wn) o 60 min p.i. (α -MEM + Wn p.i.). Las células se infectaron con *Serratia* silvestre siguiendo el procedimiento del ensayo de protección con gentamicina. A los 120 o 360 min p.i. las células se lisaron con Tritón X-100 0,05% y se determinaron las UFC en placas de LB. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes (nd: no determinado).

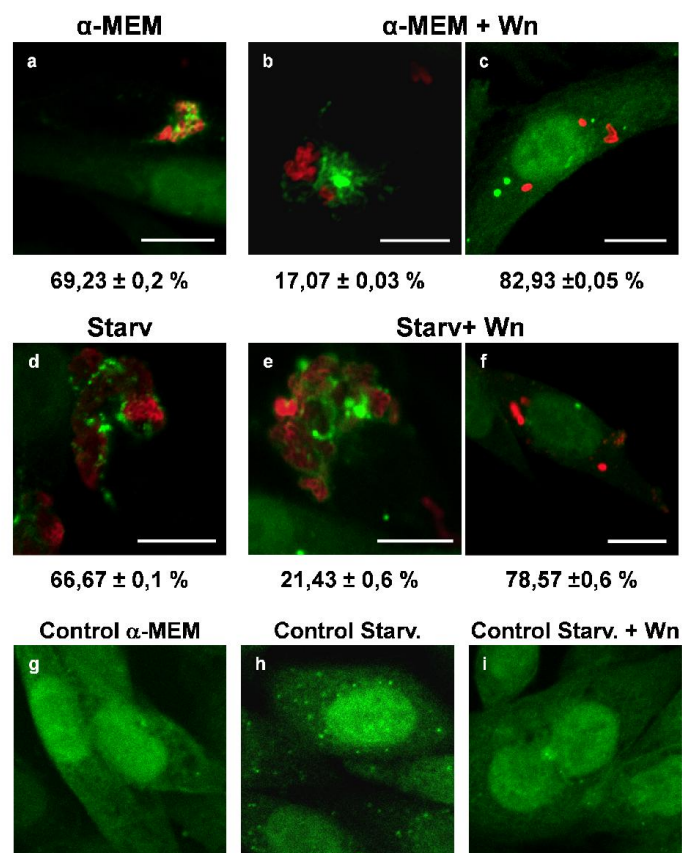


Figura 16. Análisis de la inducción o inhibición de la autofagia en la invasión de *S. marcescens* en células CHO mediante microscopía confocal. Células CHO-EGFP-LC3 sometidas al ensayo de invasión descrito en la figura 13 fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Las bacterias se detectaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3. En los ensayos donde se utilizó wortmanina, se muestran imágenes de las SeCV observadas (paneles c y f) y de los campos escasamente invadidos (paneles b y e). Los paneles inferiores muestran imágenes de células control no invadidas incubadas con α -MEM (panel g), con medio de hambre (Control Starv, panel h) y con medio de hambre + wortmanina (panel i). Barra: 10 μ m. El porcentaje de células invadidas con el fenotipo mostrado se indica debajo de cada panel. Se analizaron por lo menos 200 células para cada condición; se muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes.

La Wn suprime la autofagia canónica debido a su actividad inhibitoria sobre la 3-fosfatidilinositol quinasa (PI3K), la cual también está implicada en otros procesos de tráfico de membrana. Para discriminar si el inhibidor está de alguna manera comprometiendo la entrada de *S. marcescens* a las células CHO, se adicionó Wn luego de permitir la internalización de *Serratia* (60 min p.i.). En este caso, no se observaron diferencias en el porcentaje de invasión al comparar con las células no tratadas (Figura 15).

En concordancia con estos resultados, se detectó la banda de LC3-II en todas las células invadidas con *Serratia* sin importar el tratamiento aplicado (Figura 12). Un menor índice LC3-II/LC3-I se detectó en las calles correspondientes a los tratamientos con Wn, lo que refleja el menor número de SeCV decoradas con LC3 que se encontraron en estas condiciones. Estos resultados implican que: a) *Serratia* dispara un proceso autofágico no canónico que no incluye la participación de PI3K, y b) la actividad PI3K es requerida en etapas tempranas de la interacción bacteriana con la célula epitelial, posiblemente en el proceso de internalización.

Con el objeto de corroborar estos resultados, se realizaron ensayos de protección de gentamicina en la presencia de 3-metiladenina (3-MA), otro inhibidor del proceso de autofagia cuyo blanco es PI3K (Gutierrez *et al.*, 2004). Como se puede observar en la figura 17 A, el número de UFC recuperadas, tanto a los 120 como a los 360 min p.i., se ve severamente reducido en las células tratadas con el inhibidor al comparar con las células que no poseen tratamiento. Además, al igual que en el caso de Wn, la inspección microscópica de las células permite observar que el inhibidor 3-MA no es capaz de inhibir el proceso autofágico disparado por *S. marcescens* (Figura 17 B).

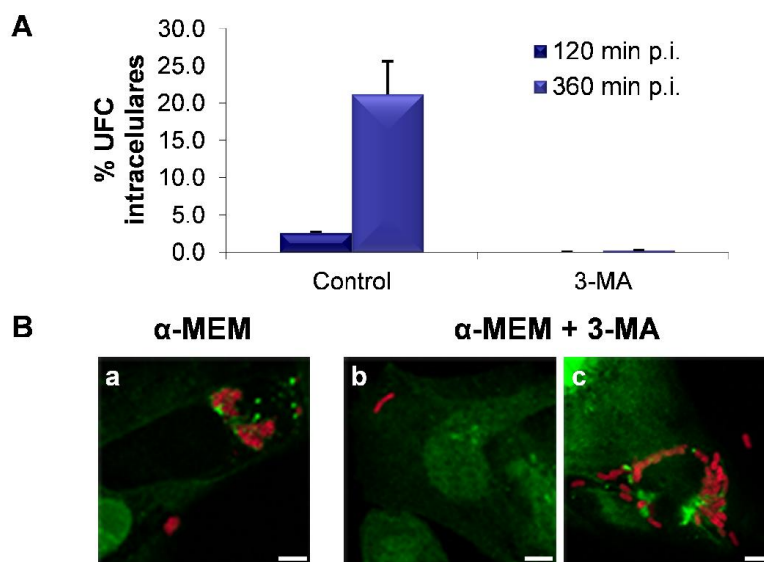


Figura 17. Inhibición del proceso de autofagia durante la invasión de *S. marcescens*. A) Células CHO-EGFP-LC3 se mantuvieron en α -MEM, o se adicionó 3-metiladenina 10 mM (3-MA) 2 hs previo al ensayo de invasión. Las células se infectaron con *Serratia* silvestre siguiendo el procedimiento del ensayo de protección con gentamicina. A los 120 o 360 min p.i. las células se lisaron con Tritón X-100 0,05% y se determinaron las UFC en placas de LB. El porcentaje de UFC intracelulares se calculó con respecto al inóculo inicial. Se muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes. B) Imágenes representativas de células CHO-EGFP-LC3 sometidas al anterior visualizadas mediante microscopía confocal. Las bacterias se detectaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3. En los ensayos donde se utilizó 3-metiladenina, se muestran imágenes de las SeCV observadas (panel c) y de los campos escasamente invadidos (panel b). Barra: 10 μ m.

Como se mencionó en la introducción general, Atg5 (del inglés **autophagy related factor 5**) es esencial para las etapas tempranas del proceso canónico de formación del autofagosoma, anterior al reclutamiento de LC3 (Xie & Klionsky, 2007). Con el objeto de seguir explorando la cascada autofágica activada por *S. marcescens*, se realizaron ensayos de invasión en dos líneas de células fibroblásticas de tejido embrionario de ratón. En estos ensayos se determinó la proliferación intracelular de la bacteria en células MEF salvajes (*Atg5*^{+/+}) y MEF *Atg5*^{-/-} (sección 9.1 de Materiales y Métodos). En la figura 18 A se observa el disparo de autofagia en las células MEF *Atg5*^{+/+} invadidas con *Serratia*, mientras que no se observa el fenotipo punteado en las células MEF *Atg5*^{-/-}. Además, como se muestra en la figura 18 B, mientras que en las células *Atg5*^{+/+} la población intracelular de bacterias aumenta significativamente entre los 120 y 360 min p.i., no se observan cambios en las UFC recuperadas de las células MEF *Atg5*^{-/-} en el mismo lapso de tiempo, lo que podría indicar que *Serratia* no es capaz de encontrar un nicho adecuado para su replicación dentro de las células MEF *Atg5*^{-/-}. Además, dado que a los 120 min p.i., el número de UFC recuperadas de la línea celular salvaje es 4 veces mayor en comparación con las células MEF *Atg5*^{-/-}, Atg5 estaría involucrado en la eficiente internalización de *Serratia*. Estos resultados

indicarían que Atg5, pero no PI3K estaría involucrado en la ruta autofágica disparada por *S. marcescens* y sugieren la necesidad de la inducción de una vía autofágica no-canónica para el desarrollo del proceso de invasión en células epiteliales.

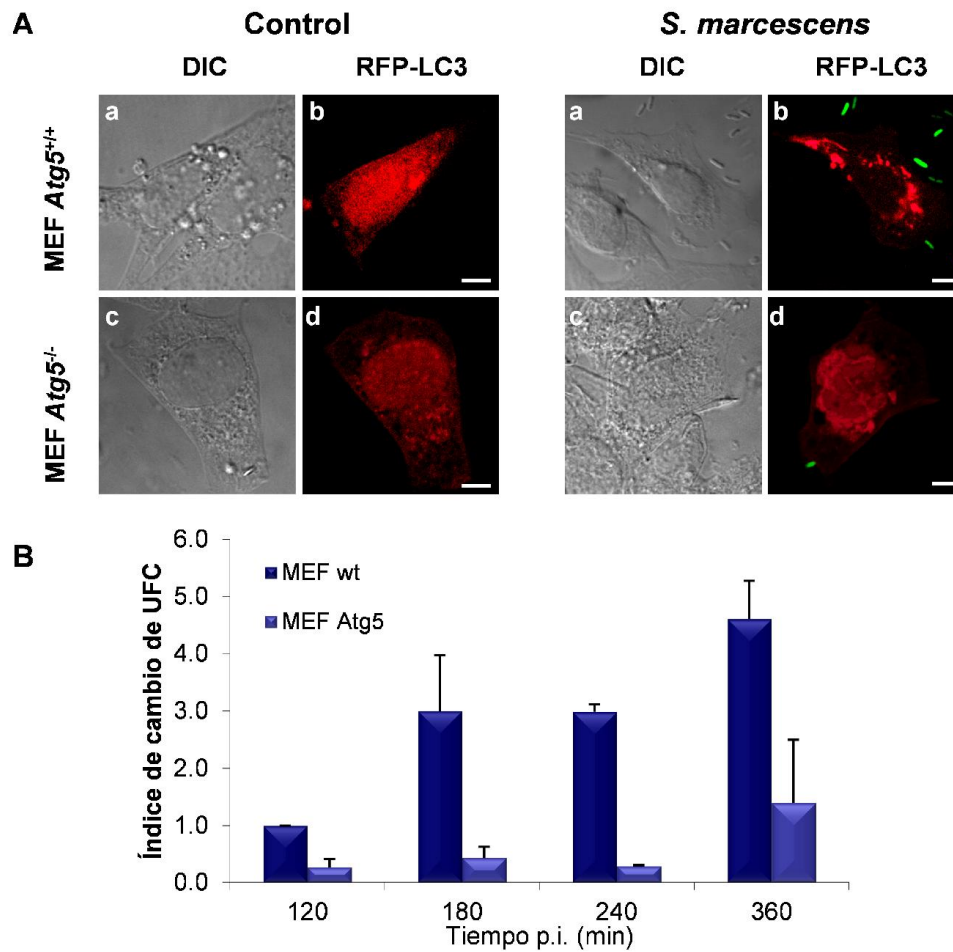


Figura 18. El proceso autofágico disparado por *S. marcescens* requiere Atg5. A) Células MEF *Atg5*^{+/+} y MEF *Atg5*^{-/-} se transfectaron de manera transiente con RFP-LC3 (fluorescencia roja) y se invadieron con *S. marcescens*/pGFP silvestre (fluorescencia verde) o se dejaron sin invadir (Control). Las células se fijaron a los 180 min p.i. y se visualizaron mediante microscopía confocal. Barra: 10 μ m. B) Células MEF *Atg5*^{+/+} y MEF *Atg5*^{-/-} se infectaron con *S. marcescens* silvestre durante 60 min. Luego, se eliminaron las bacterias extracelulares con gentamicina. A los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS y se lisaron con Triton X-100 0,05%. Se determinaron las UFC en placas de LB agar. El índice de cambio se calculó en relación a las UFC recuperadas de las células MEF *Atg5*^{+/+} a los 120 min p.i. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

CONCLUSIONES

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

- *S. marcescens* es capaz de invadir y multiplicarse en células epiteliales (células HeLa y T24) y fibroblastos (células MEF), y es capaz de disparar el proceso autofágico en estos tipos celulares sugiriendo, que es un proceso común inducido por *S. marcescens* en las distintas células hospedadoras.
- *S. marcescens* dispara un proceso autofágico no canónico que incluye la participación de Atg5 pero no de PI3K. La actividad PI3K y de Atg5 son requeridos en etapas tempranas de la interacción bacteriana con la célula epitelial, posiblemente en el proceso de internalización.
- *S. marcescens* es capaz de evitar o retrasar la fusión de las SeCV con los lisosomas, manipulando el tráfico vesicular normal de la célula y evitando de esta manera su eliminación de la célula invadida.
- Dado que el uso de inhibidores específicos de la acidificación intravacuolar provocaron una severa disminución en las UFC recuperadas desde los tiempos tempranos de la invasión se puede especular que se requiere un ambiente con bajo pH para la acción de uno o más factores bacterianos involucrado en el mecanismo de internalización o los procesos tempranos de la invasión de *S. marcescens*.

Capítulo II: Caracterización de la hemolisina ShIA

INTRODUCCIÓN

Como se describió en la introducción general, uno de los factores de virulencia mejor estudiado de *Serratia marcescens* es la hemolisina ShIA. ShIA es sintetizada como un precursor inactivo de 165 kDa que contiene un péptido señal típico en el extremo N-terminal. Luego de ser translocada a través de la membrana citoplasmática en un proceso Sec-dependiente, ShIA no hemolítica se encuentra en el periplasma sin péptido señal. La proteína ShIB (65 kDa), localizada en la membrana externa, es la responsable del transporte desde el periplasma al medio externo y la conversión a la forma hemolítica activa (Hertle, 2000). ShIA causa hemólisis de eritrocitos animales y humanos y la liberación de mediadores inflamatorios como histamina y leucotrienos de leucocitos (Hertle, 2000). Estudios previos demostraron el aumento en la patogenicidad de la cepa de *Escherichia coli* 536/21 que expresa los genes de la hemolisina. En un modelo de ratón, esta cepa mostró 5 veces mayor colonización renal que la cepa control que no expresa estos genes (Marre *et al.*, 1989). Hertle y Schwarz demostraron que la invasión de células epiteliales pero no el proceso de adherencia se veía dramáticamente reducido en una cepa mutante de *S. marcescens* incapaz de expresar la hemolisina ShIA (Hertle & Schwarz, 2004). Además, la hemolisina demostró ser citotóxica para células epiteliales en cultivo y una cepa mutante insercional en *shlBA* perdió su capacidad patogénica en un modelo de *Caenorhabditis elegans* (Hertle *et al.*, 1999).

Durante su tesis doctoral, la Dra. Griselda Fedrigo determinó que la hemolisina ShIA de *S. marcescens*, expresada heterológamente en *E. coli* W3110, es un factor capaz de inducir el proceso de autofagia en las células CHO desde el espacio extracelular (Fedrigo, 2010).

RESULTADOS

1 - Rol de la hemolisina en la Autofagia

Con el fin de confirmar el rol de la hemolisina ShIA en el disparo de autofagia y determinar si es el factor determinante de este proceso, se construyó una cepa mutante de *S. marcescens* en la cual se interrumpió el gen *shlB*, impidiendo la activación y secreción de la hemolisina ShIA (sección 5.1 de Materiales y Métodos). En la figura 19 se pueden observar imágenes representativas de un ensayo de invasión

realizado en las células CHO-EGFP-LC3 con la cepa mutante *shIB*. En este ensayo, a los 60 min p.i., la mitad de los pocillos se trata con gentamicina (Figura 19 B) para eliminar las bacterias extracelulares y observar el efecto causado desde el espacio intracelular, mientras que la otra mitad se deja sin tratamiento (Figura 19 A). En la figura 19 A, en el caso de la cepa mutante *shIB* (panel f, células no tratadas), no se detecta el puntillado de LC3 característico que se observa en el desafío efectuado con la cepa silvestre de *S. marcescens* (panel b, células no tratadas). El puntillado de LC3 se encuentra solamente en un área restringida rodeando a la bacteria, mientras que se observó una distribución homogénea de LC3 en el resto del citoplasma. El fenotipo autofágico inducido por la cepa silvestre se recuperó en la cepa mutante cuando ésta se complementa *en trans* con el operón *shIBA*. En la figura 19 B puede observarse que el proceso autofágico disparado extracelularmente por *S. marcescens* salvaje se pierde al eliminar las bacterias metabólicamente activas mediante la acción de gentamicina. En estas células, sin embargo, se puede observar el reclutamiento de LC3 a la SeCV en las células invadidas.

Para cuantificar el proceso autofágico disparado por la cepa mutante *shIB* se realizaron ensayos de colocalización en la línea de células CHO que expresa de manera estable la proteína LC3 fusionada a GFP. En uno de los experimentos, cuyos resultados se grafican en la figura 20 A, la mitad de las células invadidas se lavan con PBS y se incuban con medio suplementado con gentamicina 30 µg/ml, mientras que el resto de las células se mantiene sin tratamiento. A los 180 min p.i. las muestras se fijan con paraformaldehído. En otro de los experimentos de colocalización, (cuyos resultados se grafican en la figura 20 B) todos los pocillos se lavan con PBS a los 60 min p.i. y se incuban con medio completo suplementado con gentamicina. A los tiempos indicados, las células se lavan con PBS y se fijan. En todos los experimentos, las bacterias son marcadas con un anticuerpo primario anti-*Serratia* y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo rojo Cy3.

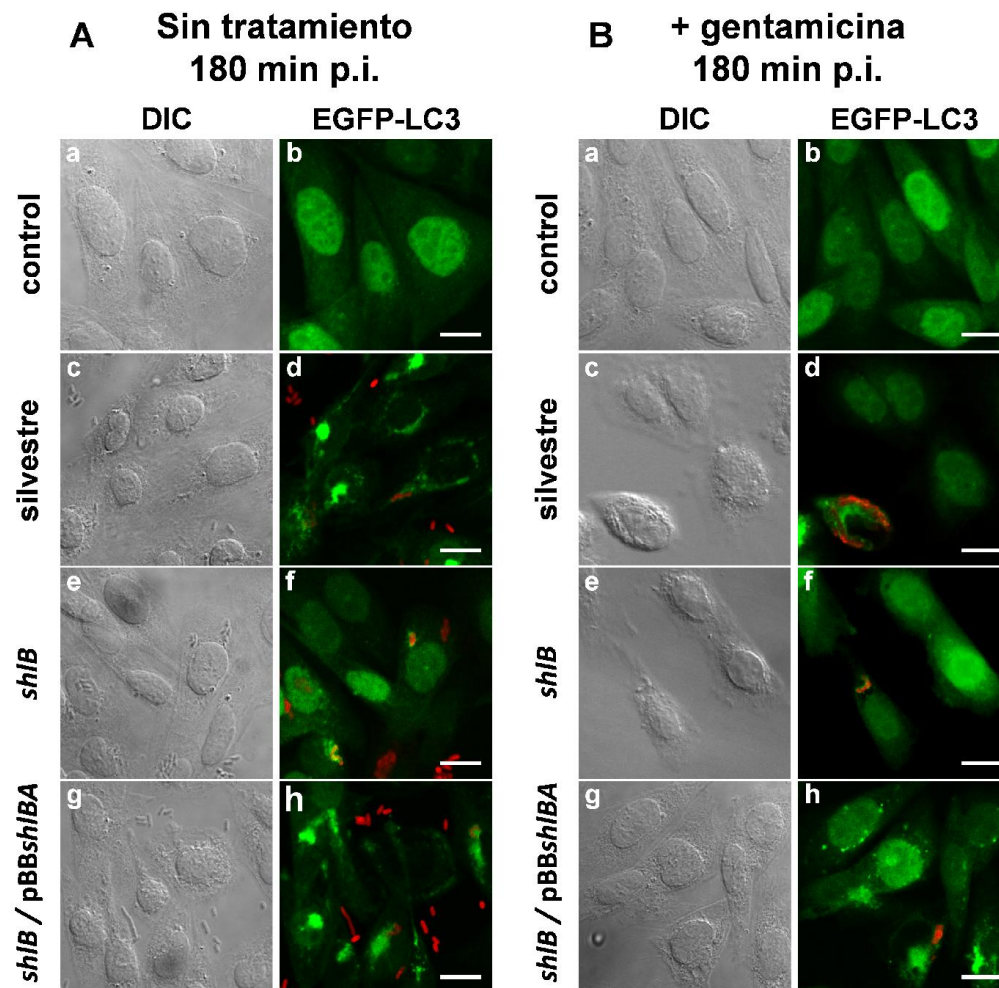


Figura 19. Análisis del proceso autofágico disparado por la cepa mutante *shIB*. Se infectaron células CHO-EGFP-LC3 con *S. marcescens* silvestre (paneles c y d), *S. marcescens shIB* (paneles e y f) o *S. marcescens shIB/pBBshIBA* (paneles g y h) y se fijaron **A**) a los 180 min p.i. o **B**) fueron tratadas con gentamicina a los 60 min p.i. y fijadas a los 180 min p.i. Se muestra como control células no infectadas (paneles a y b). Las células fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Barras: 10 μ m.

La cuantificación del proceso autofágico corroboró la incapacidad de la cepa *shIB* de disparar el proceso autofágico desde el medio extracelular (Figura 20 A: comparar 85% de células autofágicas con la cepa salvaje vs 11% con la cepa mutante, en el ensayo de invasión sin antibiótico). Sin embargo, cuando se efectuó la cuantificación en el tiempo de la presencia de vacuolas autofágicas, se observó que la cepa mutante en la hemolisina posee una vacuola con un patrón de adquisición del marcador LC3 muy similar al de la cepa salvaje, aunque el reclutamiento de dicho marcador se ve retrasado (Figura 20 B comparar las barras silvestre *versus shIB*, 120 min). Esto podría deberse a la incapacidad que posee esta cepa de gatillar el proceso autofágico desde el espacio extracelular. Estos resultados, en conjunto con las observaciones realizadas con anterioridad por la Dra. Fedrigo, demuestran que la expresión de *ShIA* es responsable del fenotipo autofágico inducido por *S. marcescens*

desde el espacio extracelular, y no estaría involucrada en el reclutamiento de LC3 a la SeCV.

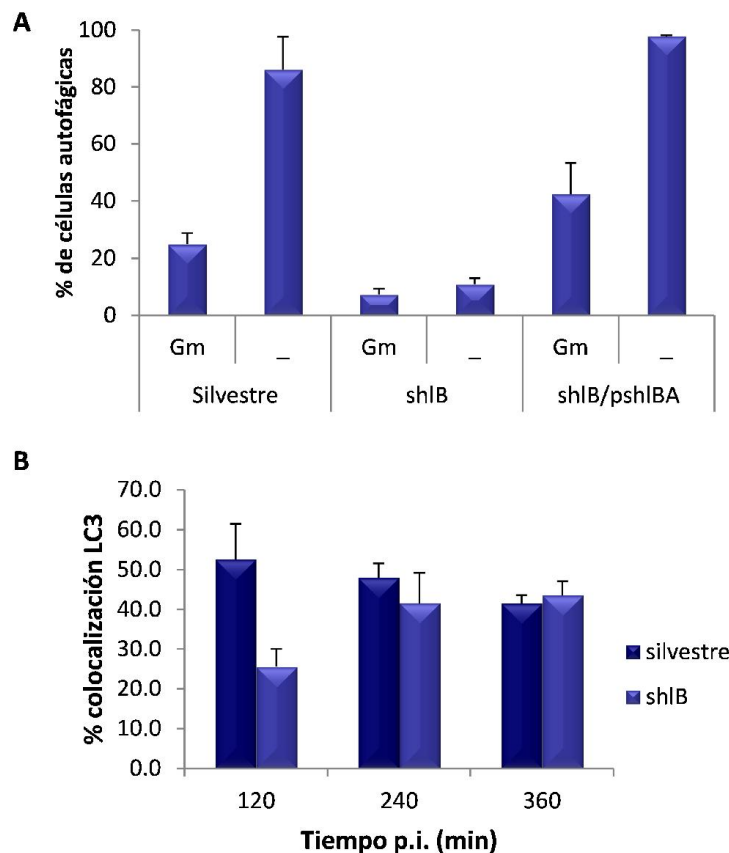


Figura 20. Cuantificación de la distribución de vacuolas que contienen a *S. marcescens* (SeCV) que colocalizan con el marcador autofágico LC3. Se infectaron células CHO-EGFP-LC3 con *S. marcescens* silvestre o *S. marcescens shIB*, **A)** la mitad de las células se trataron con gentamicina (Gm) y la otra mitad se dejó sin tratamiento (-). Las células se fijaron a los 180 min p.i. **B)** Todas las células fueron tratadas con gentamicina a los 60 min p.i. y las muestras fueron fijadas a los 120, 240 y 360 min p.i. Se analizaron al menos 300 células para cada condición. Se muestra el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes, realizados por triplicado.

2 - ShIA estaría involucrada en procesos tardíos de la invasión

Con el fin de caracterizar el proceso de invasión y replicación de la cepa *shIB*, se realizaron ensayos de protección a la gentamicina en la línea epitelial CHO y en la línea celular derivada de vejiga T24. Las UFC intracelulares recontadas hasta los 240 min p.i. no presentan diferencias entre ambas cepas de *S. marcescens* en las dos líneas celulares estudiadas (Figura 21), lo que podría estar indicando que no existen diferencias en el proceso de internalización de *S. marcescens* salvaje y *shIB*. Sin embargo, a los 360 min p.i. la cepa mutante presenta un valor de UFC intracelulares por lo menos 2 veces mayor que la cepa salvaje en ambas líneas celulares, diferencia que se hace más notable a los 480 min p.i. en la línea epitelial CHO (Figura 21 B).

Este resultado difiere del reportado por Hertle y Schwarz, quienes mostraron que la invasión de células epiteliales se veía dramáticamente reducida en una cepa mutante de *S. marcescens* incapaz de expresar ShIA (Hertle & Schwarz, 2004).

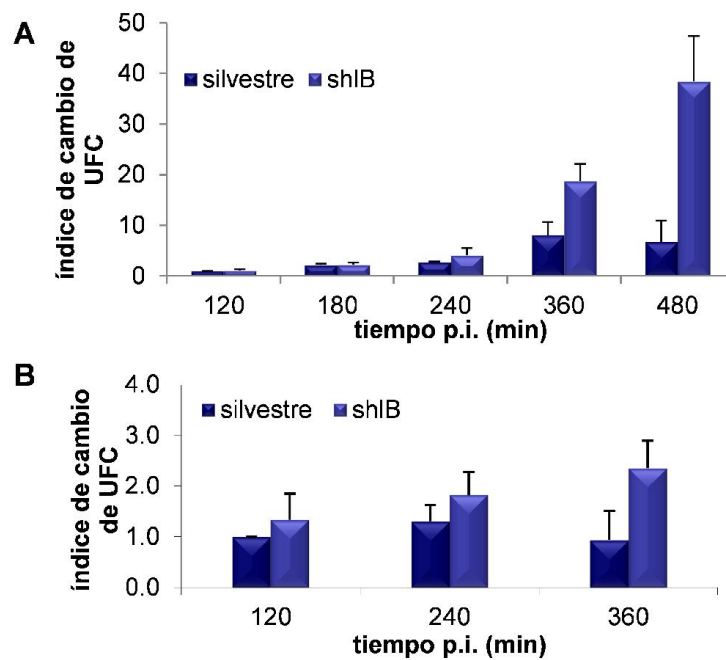


Figura 21. Curvas de invasión y replicación de la cepa mutante *shIB*. Se infectaron células **A)** CHO y **B)** T24 con *S. marcescens* salvaje y *S. marcescens shIB* durante 60 min y las bacterias extracelulares se eliminaron con gentamicina. A los tiempos indicados, se lavaron las células con PBS y se lisaron con Tritón X-100 0,05%. Las UFC se determinaron en placas de LB. Se muestran los valores de UFC relativos a los valores obtenidos a los 120 min p.i para la cepa silvestre, de tres experimentos independientes.

Debido a que la hemolisina es una toxina formadora de poros, y en otras bacterias como *Shigella flexneri* y *Listeria monocytogenes* (Kayal & Charbit, 2006; Picking *et al.*, 2005) se ha descrito que toxinas citolíticas son cruciales para lisar o dañar la vacuola que contiene a las bacterias y escapar de la misma, se decidió comprobar si el aumento observado en las UFC intracelulares a los 360 min p.i. de la cepa mutante (Figura 21), podría deberse a la incapacidad de esta cepa de dañar/afectar la vacuola que la contiene y de diseminarse al medio extracelular. Para esto, se realizó un ensayo de invasión en el cual la gentamicina fue eliminada del medio a los 180 min p.i., y a los 240 y 360 min p.i. se recontaron las UFC del sobrenadante de cada pocillo invadido, así como de las bacterias intracelulares de cada condición.

En la figura 22 se muestra la cuantificación de las bacterias intracelulares (A) y de las presentes en el sobrenadante a los 240 min p.i (B) y a los 360 min p.i. (C) para cada una de las cepas estudiadas, en presencia o ausencia de gentamicina. El número de UFC intracelulares no presentó diferencias al eliminar la gentamicina del medio extracelular (comparar en la figura 22 A las barras en presencia y ausencia de Gm, barras oscuras para la cepa silvestre y claras para la cepa mutante). La cuantificación de bacterias extracelulares mostró un valor 2,5 y 15 veces mayor para la cepa salvaje en ausencia de gentamicina (figura 22 B y C, barras oscuras con y sin gentamicina) a los 240 y 360 min p.i respectivamente, en relación a los valores obtenidos en presencia del antibiótico. Por el contrario, el número de bacterias extracelulares se mantuvo sin modificaciones para la cepa mutante, en presencia o ausencia de gentamicina a todos los tiempos estudiados. Este resultado muestra que, a diferencia de la cepa mutante *sh1B*, la cepa salvaje posee capacidad de egresar de la célula invadida, lo que concuerda con la hipótesis de que Sh1A estaría involucrada en la salida de las bacterias de la célula eucariota y en la diseminación de *S. marcescens* al medio extracelular.

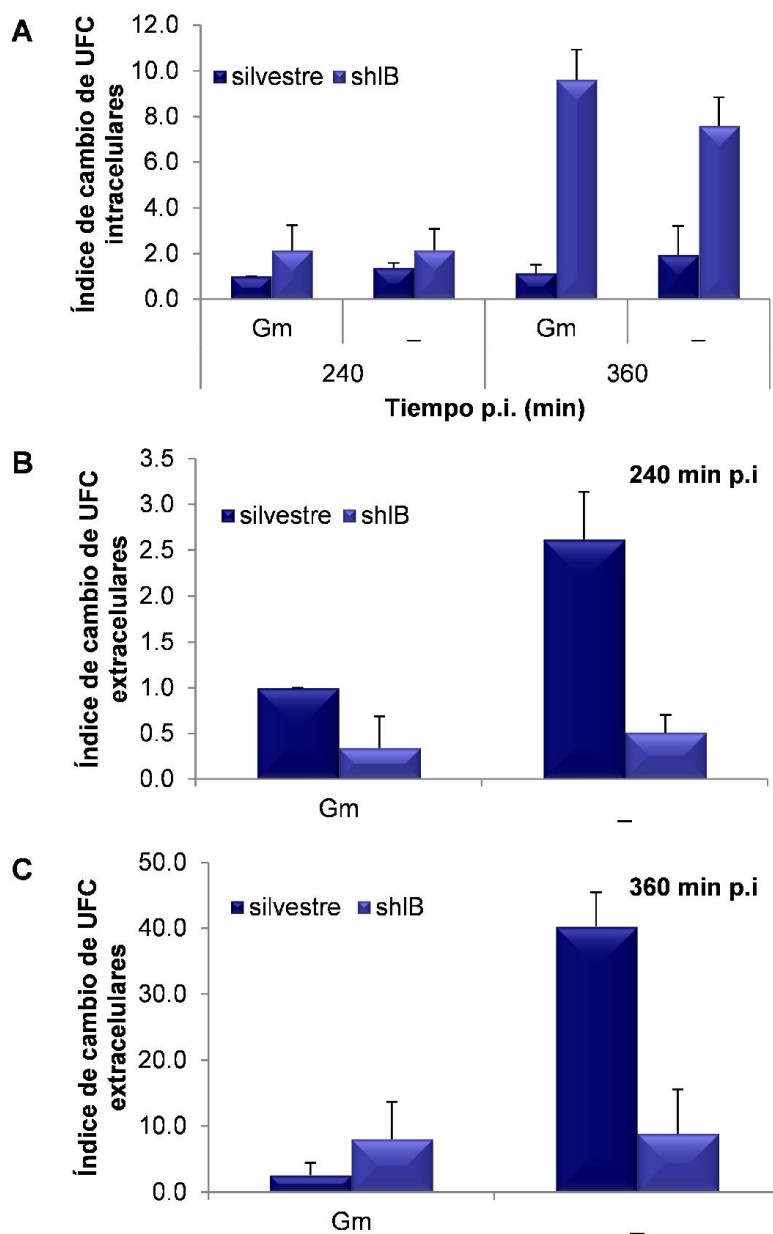


Figura 22. Determinación de la salida de *S. marcescens* de la célula eucariota. Se infectaron células CHO con *S. marcescens* silvestre o *S. marcescens shIB* durante 60 min y las bacterias extracelulares se eliminaron con gentamicina. A los 180 min p.i. se eliminó la gentamicina del medio de cultivo y a los 240 y 360 min p.i. se recuperó el sobrenadante y las células se lisaron con Tritón X-100 0,05%. Las UFC de las bacterias intracelulares (A) y de las bacterias presentes en el sobrenadante a los 240 min p.i. (B) y a los 360 min p.i. (C) se determinaron en placas de LB. El índice de cambio de UFC se determinó en relación al valor obtenido para las bacterias de la cepa salvaje en presencia de gentamicina. Se muestra el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes

3 - Caracterización del proceso de salida de la célula eucariota

Para determinar si el proceso de escape de las bacterias desde la SeCV en la célula eucariota y hacia el medio extracelular requiere el pasaje de las bacterias por el citoplasma de las células que las contienen, se realizó un ensayo de invasión seguido de la permeabilización diferencial de la célula eucariota. En este ensayo se aprovecha

la capacidad selectiva de dos detergentes para permeabilizar las membranas celulares: digitonina y saponina. Digitonina es un detergente glicósido no-iónico que permeabiliza selectivamente la membrana plasmática debido a que la misma posee una mayor concentración de colesterol comparada con las membranas intracelulares. Digitonina permeabiliza de manera reversible la membrana plasmática al formar complejos con el colesterol. Saponina es capaz de permeabilizar tanto la membrana plasmática como las membranas intracelulares (Eckhardt *et al.*, 1999; Knodler *et al.*, 2010).

En la figura 23 se puede observar que, del total de bacterias que están invadiendo las células CHO, el porcentaje de bacterias que se encuentran en el citoplasma de las mismas es menor al 30% a todos los tiempos estudiados, e incluso mucho menor a tiempos tardíos en la invasión, tiempo al cual se evidenció la salida de las bacterias al medio extracelular. Además, no se pudo observar una diferencia entre la cepa salvaje y la cepa mutante en hemolisina a ninguno de los tiempos estudiados. Esto sugiere que el proceso de escape desde las SeCV no involucraría un pasaje a través del citoplasma de la célula invadida.

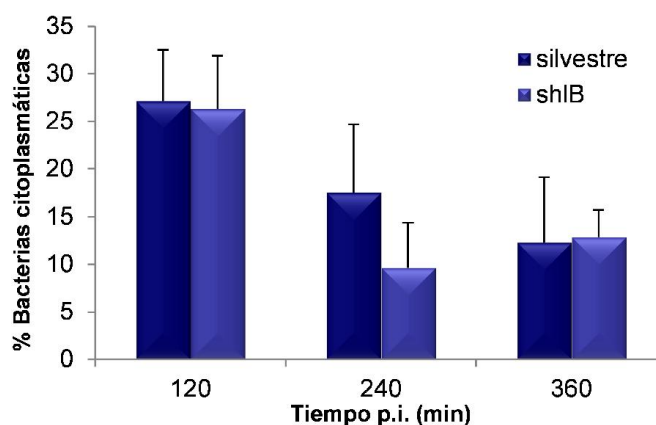


Figura 23. Cuantificación de la distribución porcentual de *S. marcescens* silvestre y mutante *shIB* que se encuentran en el citoplasma de células CHO. Células CHO fueron invadidas con *S. marcescens* silvestre y *S. marcescens shIB* durante 60 min y luego, las bacterias extracelulares se eliminaron con gentamicina. A los tiempos indicados las células se trataron con digitonina y anticuerpo anti-*Serratia*. Las células se fijaron, se trataron con anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 y se permeabilizaron con Saponina. Las bacterias intracelulares se marcaron con anticuerpo anti-*Serratia* y anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Se analizaron al menos 300 células de cada condición mediante microscopía confocal. Se muestra el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Las galectinas son pequeñas proteínas solubles que son sintetizadas sin un péptido señal por la célula eucariota. Sin embargo, pueden estar dirigidas al núcleo, ser parte de vesículas intracelulares o ser secretadas mediante una vía no-canónica (no-RE-Golgi). Se ha reportado un sorprendente número de posibles funciones para esta familia de proteínas, las que incluyen actividades nucleares, citosólicas,

intravesiculares y extracelulares. Los miembros de la familia de las galectinas se caracterizan por poseer un dominio de reconocimiento de carbohidratos altamente conservado y una gran afinidad por los β -galactósidos (Rabinovich & Gruppi, 2005). Dado que los glicoconjugados que contienen β -galactósidos no se encuentran en el citosol o el núcleo, sino que lo hacen en la cara luminal de la membrana vesicular, en la superficie celular y en el medio extracelular, las galectinas necesitan cruzar una membrana (secreción no-canónica) para llegar a ellos. Se ha sugerido que la subsiguiente interacción y unión de las galectinas a los glicoconjugados que contienen β -galactósidos puede determinar: a) su localización a sitios específicos de la membrana plasmática, b) el tiempo de residencia de un receptor específico en la superficie celular, o c) la activación de vías de señalización extracelular transmembrana que modulan la activación celular, la diferenciación y la supervivencia (Paz *et al.*, 2010).

Se ha sugerido también, que las galectinas son moléculas del tipo citoquinas/quimoquinas y poseen un importante rol en la respuesta inflamatoria (Paz *et al.*, 2010).

Las funciones mejor caracterizadas de las galectinas tienen lugar fuera de la célula, donde se unen a glicanos, y esta unión es una señal que modula el comportamiento celular. Sin embargo, el hecho de que haya galectinas en el citosol, que en condiciones fisiológicas no posee carbohidratos complejos, y que los glicanos se encuentran localizados en la cara luminal de las vacuolas celulares, hace de las galectinas moléculas útiles para monitorear la integridad vacuolar, ya que solo pueden acceder a los β -galactósidos cuando las vacuolas están dañadas. Galectina 3 (también conocida como LGALS3) es reclutada en vesículas dañadas que contienen bacterias, sin embargo, se desconocen las consecuencias funcionales de este reclutamiento. Galectina 8 monitorea la integridad endosomal y lisosomal y detecta la invasión bacteriana al unirse a glicanos que son expuestos en las vesículas dañadas que contienen a *Salmonella* en las células del organismo hospedador. Debido que, galectina 8 también detecta el daño estéril realizado a endosomas y lisosomas, al igual que la invasión de *Listeria* o *Shigella*, se ha sugerido que galectina 8 puede ser un detector versátil para aquellos patógenos que dañan vesículas (Thurston & Wandel, 2012).

Dado que la bibliografía reciente ha demostrado que galectina 8 es un eficaz marcador del daño vacuolar tanto estéril como ocasionado por patógenos

intracelulares y que a tiempos tardíos de infección se detectó el egreso de *S. marcescens* de las células invadidas, se realizaron ensayos de localización de galectina 8 en células CHO invadidas con *S. marcescens* salvaje y *shIB*. Para esto, se transfectó de manera transiente a las células CHO con un plásmido que codifica para galectina 8 fusionada a la proteína fluorescente YFP (del inglés **y**ellow **f**luorescent **p**rotein). 24 horas después de la transfección se procedió a invadir las células y a los 120 y 360 min p.i. se realizó la fijación de las mismas. Las bacterias fueron marcadas con un anticuerpo anti-*Serratia* y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3.

En la figura 24 se muestran imágenes representativas de la localización de galectina 8 realizadas en células invadidas con la cepa silvestre (Figura 24 B, A), con la cepa mutante *shIB* (Figura 24 B, B) y células sin invadir (Figura 24 B, C). Se puede observar el reclutamiento de galectina 8 en la vacuola que contiene a la cepa silvestre, y la ausencia de la misma en la vacuola que contiene a la cepa mutante en la hemolisina. La cuantificación de este experimento (Figura 24 A) demuestra que a los 360 min p.i. más del 60 % de las SeCV reclutan galectina 8 y que este proceso es dependiente de la presencia de la hemolisina. Esto estaría sugiriendo que *S. marcescens* utiliza la hemolisina ShIA para dañar su vacuola, y esto favorecería un proceso de escape de la misma hacia el espacio extracelular.

De una manera similar al ensayo descrito anteriormente, se estudió la colocalización de galectina 3 con las vacuolas de *S. marcescens* silvestre y *shIB*. Sin embargo, no se detectó reclutamiento de galectina 3 a la SeCV de ninguna de las cepas estudiadas a ninguno de los tiempos analizados. Esto implicaría que galectina 3 no estaría siendo reclutada a la vacuola dañada de *Serratia*.

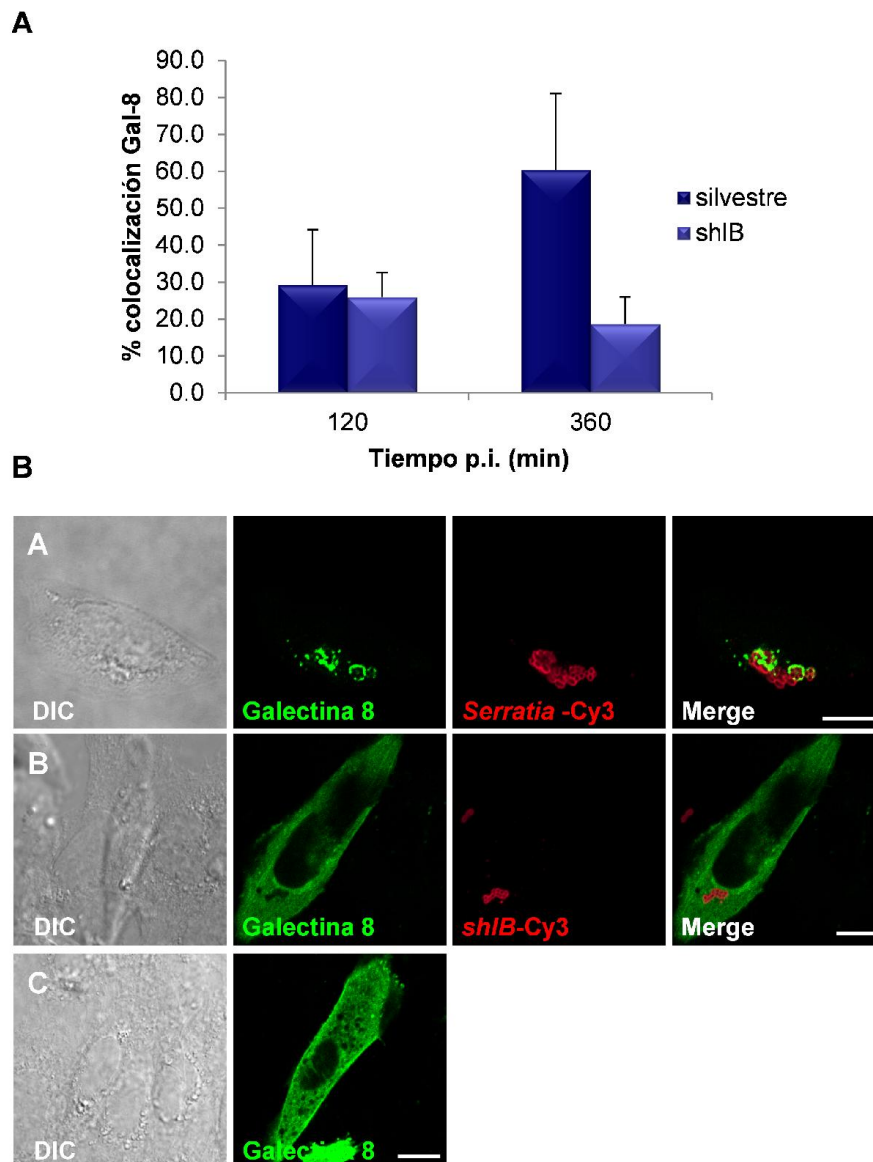


Figura 24. Colocalización con el marcador de daño vacuolar Galectina 8. A) Células CHO se transfectaron de manera transiente con galectina 8-YFP y se invadieron con *S. marcescens* silvestre o con *S. marcescens* shIB. Las células se fijaron a los tiempos indicados y las bacterias se marcaron con anticuerpos anti-*Serratia* y anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Se analizaron al menos 300 células para cada condición y se muestra el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado. B) Imágenes representativas de microscopía confocal de células CHO transfectadas con galectina 8- YFP (fluorescencia verde invadidas durante 360 min con A) *S. marcescens* silvestre (fluorescencia roja), B) *S. marcescens* shIB (fluorescencia roja) o C) sin invadir. Barra: 10 μ m.

Se ha descrito que *S. marcescens* y la hemolisina ShIA producen citotoxicidad desde el medio externo en distintas líneas celulares (Hertle & Schwarz, 2004). Durante el proceso de salida y diseminación, *S. marcescens* podría estar ejerciendo un efecto citotóxico desde el interior celular provocando daños o la lisis de la célula eucariota. Alternativamente, las bacterias podrían estar saliendo por un proceso controlado que no produciría daño en la célula o su membrana. La medida de la actividad de Lactato

Deshidrogenasa (LDH) es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células eucariotas vivas y la muerte celular o los agentes exógenos o endógenos que dañan la membrana celular provocan la liberación de la misma, que por lo tanto se convierte en un reportero útil para monitorear el daño celular (Galluzzi *et al.*, 2009). El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células dañadas o permeabilizadas. Teniendo esto en cuenta, se midió la actividad LDH en los sobrenadantes y lisados totales de células CHO sometidas al ensayo de invasión descrito en la figura 22 (sección 9.9 de Materiales y Métodos).

En la figura 25 se muestra que no hay diferencias en el porcentaje de citotoxicidad que presentan las células invadidas o no invadidas (control -), ni en la invasión con las dos cepas estudiadas en presencia o ausencia de gentamicina. Estos resultados implicarían que ni la invasión ni el proceso de salida de *S. marcescens* producen la permeabilización de la membrana plasmática de la célula eucariota ni un efecto citotóxico sobre la misma.

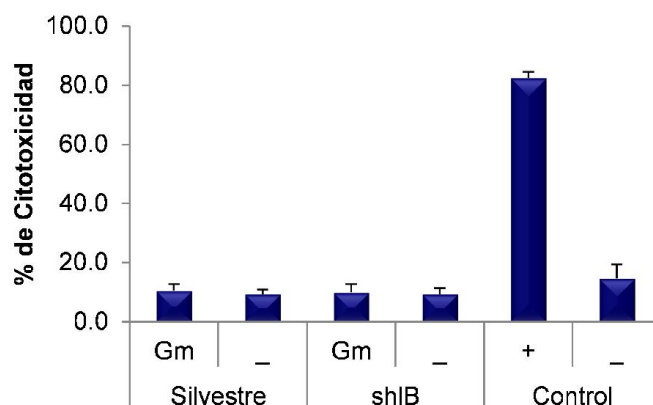


Figura 25. Citotoxicidad mediada por *S. marcescens* en células CHO. Se midió la actividad de LDH en los lisados totales y sobrenadantes de células CHO sometidas a un ensayo de invasión como el descrito en la figura 22, a los 360 min p.i. El % de citotoxicidad se calculó como la actividad enzimática del sobrenadante sobre la actividad total. Se muestra el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

4 - Caracterización del modelo de invasión de la mutante

Como se mostró en el capítulo I, la presencia de Bafilomicina A1 o NH_4Cl provoca una severa disminución en las UFC recuperadas de la cepa salvaje desde los tiempos tempranos de la invasión (Fedrigo *et al.*, 2011). Esto permitiría especular que se requiere un ambiente con bajo pH para la acción de un factor bacteriano involucrado en los procesos tempranos de interacción bacteria-hospedador,

probablemente ligado a la internalización de *S. marcescens*. Para determinar si este efecto también se observa en la cepa mutante *shIB*, se realizaron ensayos de protección de gentamicina en presencia de Bafilomicina A1 y NH_4Cl .

Como puede observarse en la figura 26, también se cuantificó una fuerte disminución en las UFC recuperadas de la cepa mutante en todos los tiempos ensayados, en presencia de Bafilomicina A1 o de NH_4Cl . Esto permitiría especular que el factor bacteriano que requeriría de un ambiente ácido para mediar los procesos tempranos en la interacción de *S. marcescens* con la célula hospedadora, no sería la hemolisina. Este resultado, junto al hecho que a tiempos tempranos de la infección las UFC recuperadas para la cepa salvaje y mutante son similares (Figura 21), indicaría que ambas cepas ingresan por un mecanismo común, lo que sugeriría que ShIA no sería esencial para este proceso. Sin embargo es necesario caracterizar los procesos tempranos de invasión de ambas cepas y la vacuola que contiene a *shIB* para poder confirmar esta conclusión.

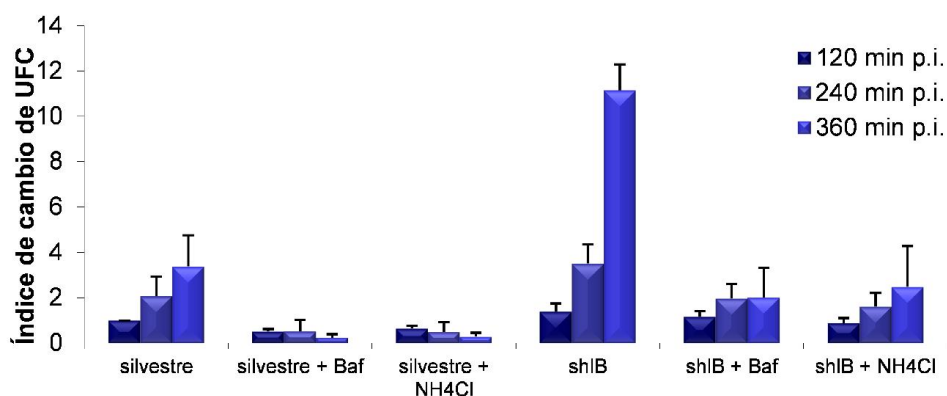


Figura 26. Efecto de la inhibición o neutralización de la acidificación en la invasión de *S. marcescens shIB*. Células CHO que se mantuvieron en α -MEM, fueron tratadas con Bafilomicina A1 100 nM o NH_4Cl 10 mM, se invadieron con *S. marcescens* silvestre o *S. marcescens shIB*. A los 60 min p.i. se eliminaron las bacterias extracelulares con gentamicina, y a los tiempos indicados se lisaron las células con Tritón X-100 0,05% y se determinaron las UFC en placas de LB. El índice de cambio se calculó con respecto al valor obtenido a los 120 min p.i para las células sin tratamiento invadidas con la cepa silvestre. Se muestra el promedio y desvío estándar de tres experimentos independientes.

5 - Localización de la hemolisina ShIA

Con el fin de determinar la localización de la hemolisina se realizaron inmunodetecciones de la misma en distintas fracciones del cultivo bacteriano. Cultivos de 16 horas crecidos en medio LB a 30 °C sin agitación, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en buffer de siembra, como se describe en la sección 6.2 de materiales y métodos (Extracto Total). El sobrenadante de dicho cultivo se filtró y las proteínas fueron precipitadas con TCA 12 % y resuspendidas en buffer de siembra

(Sobrenadante, sección 6.1 de Materiales y Métodos). A su vez, se separaron fracciones soluble e insoluble a partir de las células bacterianas de este cultivo: las fracciones solubles e insolubles se prepararon a partir del sedimento de bacterias. El mismo se resuspendió en 10 mM Tris pH 8 y se sometió a sonicación con el fin de fraccionar las células bacterianas. Las dos fracciones (soluble e insoluble) se separaron mediante centrifugación, en la que el sobrenadante consiste en la fracción soluble y el sedimento de la sonicación es la fracción insoluble del cultivo bacteriano (sección 6.2 de Materiales y Métodos). Todas estas fracciones fueron resueltas mediante SDS-PAGE, y posterior inmunodetección utilizando los anticuerpos anti-ShIA.

En la figura 27 se muestran imágenes representativas de las inmunodetecciones realizadas. En la figura 27 A se puede observar la banda perteneciente a ShIA en las muestras de sobrenadantes de cultivos de las cepas silvestre y *shIB/pshIBA*, pero no así en la muestra de la cepa mutante *shIB*. No se detectó banda inmunoreactiva en el peso molecular esperado en los extractos totales de las diferentes cepas bacterianas. En la figura 27 B se puede observar la banda correspondiente a ShIA en la fracción insoluble de la célula bacteriana, tanto de la muestra silvestre como de la muestra de la cepa *shIB/pshIBA*. Cabe destacar que se observa una señal de mayor intensidad para las muestras de la cepa mutante complementada respecto de la cepa silvestre. Esto podría deberse a que la complementación a través de un vector plasmídico produce sobreexpresión de hemolisina, como se pudo determinar a través de la medición de la actividad hemolítica (Figura 28 A), donde la cepa *shIB/pshIBA* posee 6 veces más actividad hemolítica que *S. marcescens* silvestre. En las muestras pertenecientes a la cepa silvestre y a la cepa mutante complementada se puede observar la banda correspondiente a ShIA en la fracción insoluble celular y en el sobrenadante del cultivo. Esta localización se corresponde con la bibliografía existente que describe a la hemolisina como una proteína no estructural de membrana externa, cuyo anclaje a la misma es dependiente de fosfoetanolamina y que a su vez es parcialmente secretada al medio extracelular (Schiebel *et al.*, 1989).

En las muestras pertenecientes a la mutante *shIB* se puede observar la banda perteneciente a la hemolisina solo en la fracción soluble de las bacterias (Figura 27 B). Este resultado coincide con la bibliografía, donde se determinó que la ausencia de la proteína ShIB impide la correcta translocación y activación de la hemolisina a través de la membrana externa y su acumulación en el periplasma de la bacteria (Ondraczek *et*

al., 1992; Poole *et al.*, 1988; Pramanik *et al.*, 2013). Sin embargo, dado que la localización de la inserción de pKNOCK en *shIB* debería impedir la transcripción de todo el operón, la detección de hemolisina en la fracción soluble implicaría que el operón tiene un promotor interno que no fue interrumpido por la mutación o que algún promotor perteneciente a la inserción del plásmido pKNOCK:*shIB* (sección 5.1 de Materiales y Métodos) permite la transcripción y consiguiente traducción de la hemolisina ShIA. No obstante existen numerosos reporte en la bibliografía que indican que la activación de la hemolisina requiere de ShIB funcional (Hertle, 2000; Pramanik *et al.*, 2013).

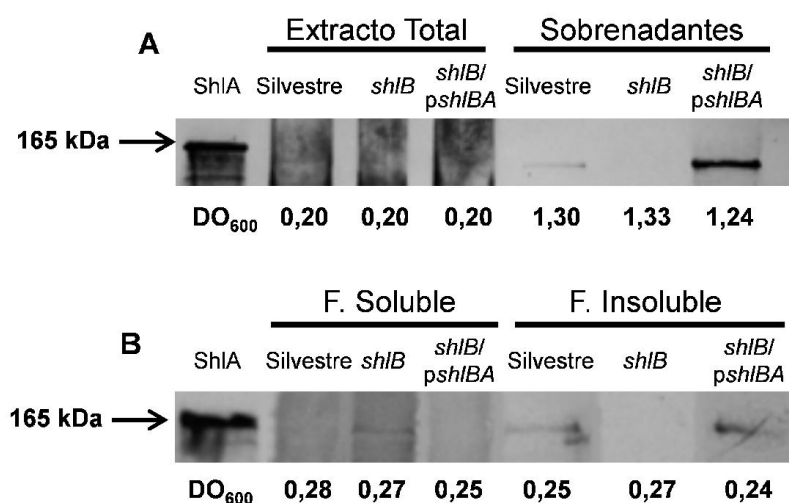


Figura 27. Inmuno-detección de hemolisina ShIA. Extractos proteicos totales, sobrenadantes de cultivos (SN), fracciones solubles (F. Soluble) e insolubles (F. Insoluble) de las cepas *S. marcescens* salvaje, *shIB* y *shIB/pshIBA*, se analizaron por SDS-PAGE y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó con anticuerpo primario anti-hemolisina y un anticuerpo secundario conjugado a (A) fosfatasa alcalina o (B) a peroxidasa de rabanita. A la izquierda de la imagen se especifica la masa molecular de las bandas reveladas.

Para corroborar la presencia de hemolisina en las distintas fracciones se midió la actividad hemolítica frente a una suspensión fresca de eritrocitos (sección 7 de Materiales y Métodos). La figura 28 B muestra que las únicas fracciones que presentan actividad hemolítica son las que corresponden a las bacterias crecidas en cultivo 16 horas y la fracción celular insoluble. Cabe aclarar que el sobrenadante que se utiliza en la inmunodetección posee un incremento de 5 veces en la cantidad de muestra respecto de la utilizada para la determinación de la actividad hemolítica, por lo que la ausencia de detección de actividad en el sobrenadante de cultivo se podría deber a la falta de sensibilidad del método y no necesariamente a que la proteína presente en el sobrenadante sea inactiva. Sin embargo, en la bibliografía se ha descrito que la vida media de la actividad hemolítica de ShIA liberada en el medio de

cultivo es de 2,5 min y que los sobrenadantes de cultivo no poseen actividad hemolítica (Hertle, 2000; Walker *et al.*, 2004).

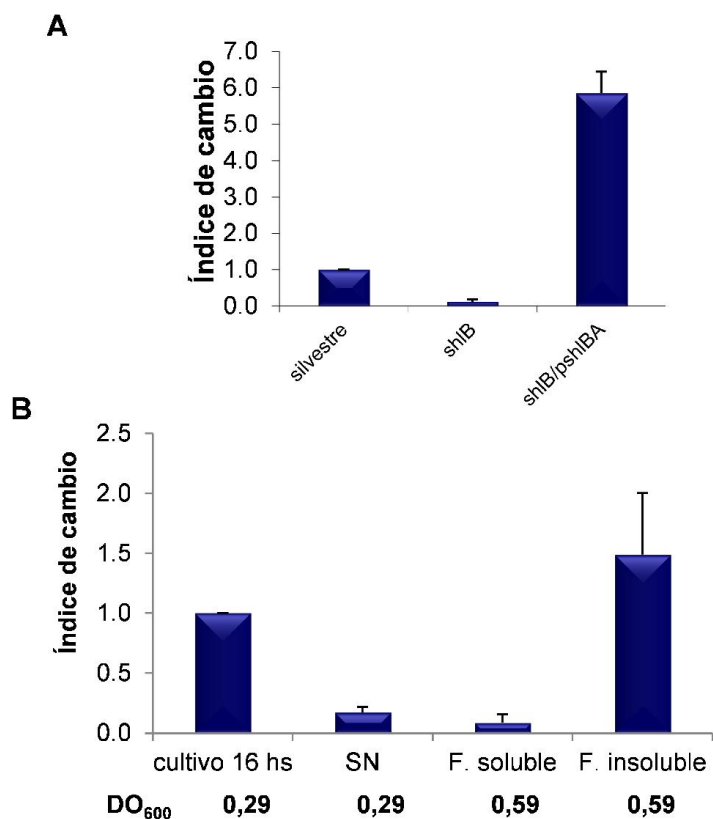


Figura 28. Determinación de la Actividad Hemolítica de *S. marcescens*. (A) Cultivos de *S. marcescens* silvestre, *shiB*, *shiB/pshiBA* o (B) cultivos, sobrenadantes de cultivos (SN), fracciones solubles (F. Sol.) e insolubles (F. Ins.) de un cultivo de 16 hs a 30 °C sin agitación de *S. marcescens* salvaje se mezcló con igual volumen de eritrocitos resuspendidos en PBS. Luego de 1 hora de incubación a 30 °C, las muestras se centrifugaron y se cuantificó la liberación de hemoglobina por la medida de absorbancia a $\lambda = 562$ nm. Este valor se relativizó la proporción del valor de absorbancia a $\lambda = 630$ nm de cada muestra. El índice de cambio se calculó con el valor obtenido para el cultivo entero. Se muestra el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

CONCLUSIONES

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

- La expresión de ShIA es responsable del fenotipo autofágico inducido por *S. marcescens* desde el espacio extracelular. Una vez que la invasión ha tenido lugar, dado que la colocalización intracelular de la cepa mutante *shIB* con LC3 es similar a la colocalización de la cepa silvestre, ShIA no estaría involucrada en el reclutamiento de LC3 a la SeCV y serían otro u otros factores bacterianos los involucrados en este proceso.

- Dado que *S. marcescens* es capaz de egrasar de la célula hospedadora, a diferencia de la mutante *shIB*, lo cual se evidencia por la ausencia de bacterias en el medio extracelular y la acumulación de bacterias intracelulares a tiempos tardíos, ShIA estaría involucrada en la salida de las bacterias desde la célula eucariota y en la diseminación de *S. marcescens* al medio extracelular.

- A tiempos tardíos más del 60 % de las SeCV reclutan galectina 8 y este proceso es dependiente de la presencia de la hemolisina. Esto sugiere que *S. marcescens* utiliza la hemolisina ShIA para dañar su vacuola, y esto favorecería un proceso de escape de la misma hacia el espacio extracelular. Además, el proceso de escape de *S. marcescens* desde las SeCV no involucraría un pasaje a través del citoplasma de la célula invadida y no provocaría alteraciones en la integridad de dicha célula.

- Los procesos tempranos en la interacción de *S. marcescens* con la célula hospedadora requerirían de un ambiente ácido. El o los factores involucrados en este estadio temprano no incluirían a ShIA, ya que los resultados mostrados a lo largo de este capítulo permitirían descartar una contribución de ShIA en la internalización de la bacteria a la célula epitelial.

- La inmunodetección y medición de actividad hemolítica de ShIA, permitió corroborar un patrón de localización y actividad similar a lo reportado en la bibliografía.

Capítulo III: Caracterización de los procesos de invasión y replicación de *S. marcescens* en *D. melanogaster*

INTRODUCCIÓN

Como se describió en la introducción general, *S. marcescens* es un potente patógeno de *Drosophila*. En un modelo de herida séptica, unas pocas bacterias introducidas directamente en la hemolinfa son suficientes para matar a la mosca en menos de 24 horas (Nehme *et al.*, 2007). A pesar de que se induce una respuesta inmune fuerte y sistémica, las bacterias son resistentes a los AMPs y las moscas sucumben ante la masiva proliferación de las bacterias en la hemolinfa. De manera interesante, las moscas no sucumben en un modelo de infección oral con *S. marcescens*, a pesar que un número bajo pero significativo de bacterias es recuperado de la hemolinfa de las moscas unas pocas horas post-infección, lo que sugiere que *Serratia* es capaz de cruzar rápidamente la barrera intestinal (Nehme *et al.*, 2007).

Conociendo estos antecedentes, en este capítulo de la tesis se utilizaron distintas cepas mutantes de *S. marcescens* en los modelos de infección de *D. melanogaster*, con el fin de identificar los factores de virulencia y las estrategias de invasión y colonización que son importantes en los modelos de herida séptica e infección oral.

RESULTADOS

1 - Validación del modelo de infección oral con *S. marcescens* salvaje

Como se mencionó en la introducción general, se estableció una colaboración entre los laboratorios de la Dra. García Vescovi y el Dr. Ferrandon. El modelo de herida séptica de *D. melanogaster*, desarrollado en el laboratorio del Dr. Ferrandon, utiliza *S. marcescens* Db11, como cepa silvestre, la cual provoca la muerte del insecto en menos de 24 horas luego de la inyección (Nehme *et al.*, 2007). Con el fin de contrastar estos resultados utilizando nuestro aislamiento de origen clínico, *S. marcescens* RM66262, se realizaron ensayos de herida séptica en grupos de 40 insectos. Los mismos fueron infectados con ambas cepas de *S. marcescens* y *E. coli* no patogénica DH5 α , como control negativo del ensayo. En la figura 29 se muestra el porcentaje de supervivencia de las moscas en función del tiempo. Estos ensayos permiten demostrar que ambas cepas de *S. marcescens* son capaces de matar a los insectos en menos de 24 horas, con una cinética similar. Estos resultados permitirían sugerir

que ambas cepas de *S. marcescens* tendrían un comportamiento análogo en este modelo de infección.

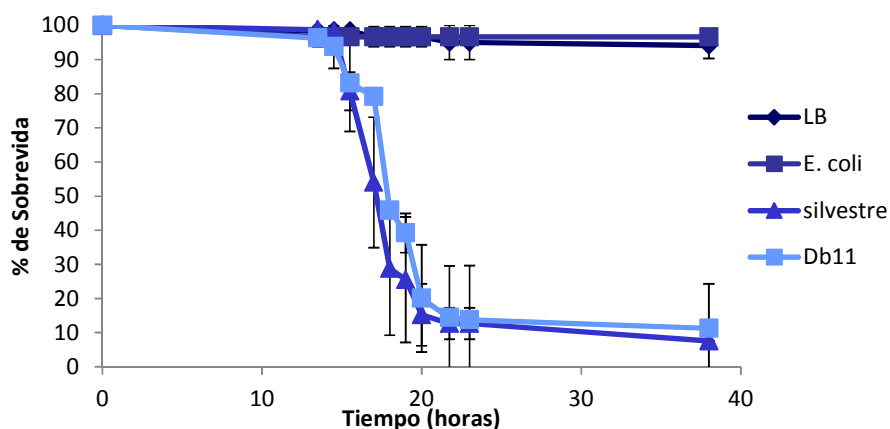


Figura 29. Análisis de la eficacia de distintas cepas de *S. marcescens* en un modelo de infección por herida séptica en *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos fueron infectados mediante herida séptica con cultivos de *S. marcescens* salvaje (RM66262), *S. marcescens* Db11 y *E. coli* no patogénica, crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con medio LB hasta $DO_{630} = 0,1$. Se utilizó como control negativo medio LB estéril. Se muestra el promedio y desvío estándar de 3 experimentos independientes.

2 - Caracterización de las cepas mutantes de *S. marcescens* en el modelo de infección mediante herida séptica

La inyección directa de las distintas cepas de *S. marcescens* en la hemolinfa de *Drosophila*, es un modelo rápido y reproducible para medir el grado de virulencia de las distintas cepas mutantes y su capacidad de matar a los insectos por bacteremia. En la figura 30 se puede observar que las cepas mutantes *shIB*, *prtA* y *phlAB* no presentan diferencias en los porcentajes de supervivencia con respecto a la cepa salvaje. Por el contrario, la cepa mutante en el regulador transcripcional *rscB* mostró ser más virulenta que la cepa salvaje. Puesto que RcsB controla pleiotrópicamente diversos factores involucrados en virulencia, este resultado sugiere que la mutación de un factor de virulencia individual no causaría grandes diferencias en la curva de muerte de *D. melanogaster* causada por *S. marcescens*. Sin embargo, la mutación de un factor transcripcional, involucrado en la regulación de distintos factores de virulencia (cápsula, flagelo, hemolisina) (Castelli & Véscovi, 2011), es capaz de causar la muerte de los insectos a tiempos más tempranos que *S. marcescens* silvestre. En este caso, no se puede atribuir el aumento de la virulencia a uno de los factores regulados por RcsB en particular, pero se podría especular que la hiperproducción de hemolisina ShlA, en acción conjunta a otros factores, podría contribuir a este aumento de virulencia, aunque no se puede descartar la acción conjunta de los distintos factores

regulados por RcsB (Di Venanzio, G; Stepanenko, T y García Véscovi E, manuscrito enviado para su publicación).

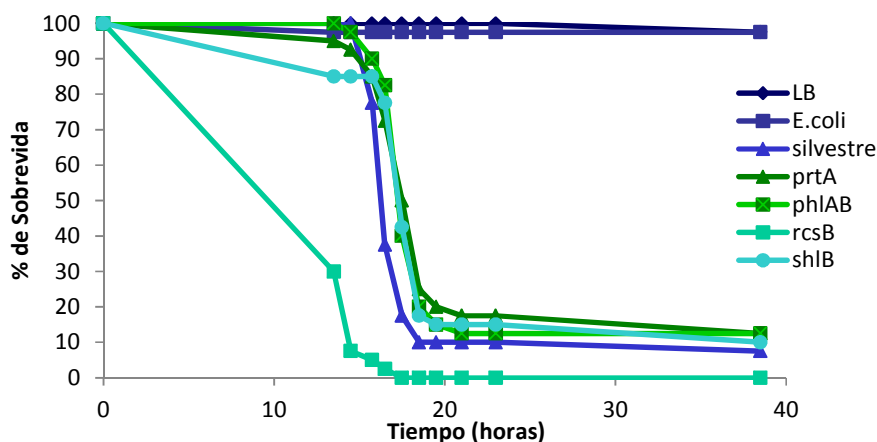


Figura 30. Invasión de distintas cepas mutantes de *S. marcescens* mediante herida séptica en *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos fueron infectados mediante herida séptica con cultivos de *S. marcescens* silvestre, *S. marcescens prtA*, *S. marcescens phlAB*, *S. marcescens rcsB*, *S. marcescens shlB* y *E. coli* no patógena, crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con medio LB hasta $DO_{630} = 0,1$. Se utilizó como control negativo medio LB estéril. Se muestra el promedio de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces

Luego, se evaluó la virulencia de distintas cepas mutantes cuya característica común es la ausencia de flagelo. Los resultados que se muestran en la figura 31, permiten afirmar que las cepas mutantes en los reguladores transcripcionales de la cascada flagelar de tipo I y II, *flhD* y *fliA* no presentan diferencias respecto a la cepa salvaje en el modelo de herida séptica. Esto implicaría que el flagelo no estaría involucrado en los mecanismos de virulencia desplegados por *S. marcescens* en el modelo de infección sistémica de *D. melanogaster*. Sin embargo, cepas mutantes en componentes de la vía de síntesis del antígeno común de enterobacterias (ECA), las cepas *wecG* y *wecD* mostraron ser menos virulentas que la cepa silvestre. Luego de 18 horas de infección sólo el 10% de los insectos infectados con *S. marcescens* salvaje sobrevivió, mientras que en las cepas mutantes el porcentaje de supervivencia es mayor al 70%. De estos ensayos se puede sugerir, que en el caso de las mutantes *wec*, otros factores, como la alteración del ECA y/o la activación de RcsB (Castelli & Véscovi, 2011) y no la falta de flagelo ni de hemolisina estarían afectando la virulencia de estas cepas en el modelo de herida séptica. De modo interesante, tanto los resultados mostrados en Figura 30 como en Figura 31 se correlacionan indicando que tanto en su estado reprimido (*rcsB*) como activado (*wecG* o *wecD*) el regulador RcsB modula el potencial patogénico de *Serratia* en este modelo de infección.

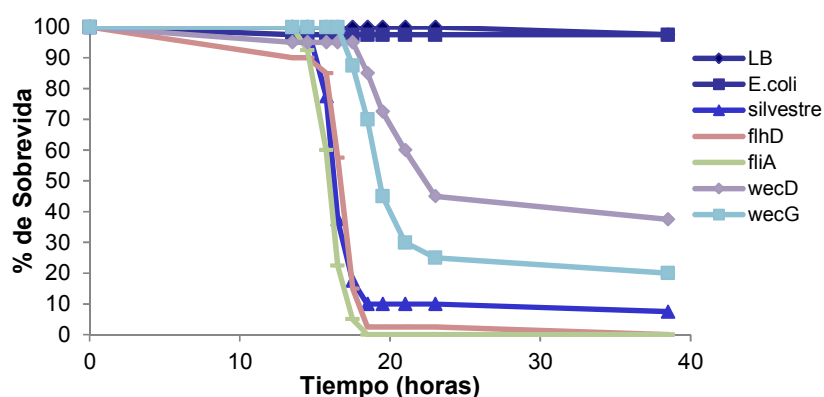


Figura 31. Invasión de distintas cepas mutantes de *S. marcescens* mediante herida séptica en *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos fueron infectados mediante herida séptica con cultivos de *S. marcescens* silvestre, *S. marcescens flhD*, *S. marcescens fliA*, *S. marcescens wecD*, *S. marcescens wecG* y *E. coli* no patogénica, crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con medio LB hasta $DO_{630} = 0,1$. Se utilizó como control negativo medio LB estéril. Se muestra el promedio de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces

En paralelo, se decidió evaluar la capacidad de virulencia de la cepa mutante en el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, *phoP*, una mutante insercional sobre el gen *phoP* que posee efecto polar sobre el gen *phoQ*, y las cepas mutantes en dos transportadores de Mg^{+2} , *mgtE1* el cual es dependiente del sistema PhoP/PhoQ, y *mgtE2*, en el cual, a través de análisis bioinformático, se encontró una secuencia consenso de unión a PhoP (caja PhoP), además de una mutante insercional doble en los transportadores *mgtE* (*doblemgtE*) (Barchiesi *et al.*, 2012). En la figura 32 se muestran los porcentajes de supervivencia de estas cepas en función del tiempo en el modelo de herida séptica de *D. melanogaster*. En este caso, sólo la cepa *phoP* mostró diferencias con la cepa salvaje, ya que luego de 23 horas de infección más del 70% de los insectos infectados con la cepa *phoP* sobrevivieron la infección mientras que solo el 5% de los insectos infectados con la cepa salvaje lo hizo. Esta disminución de la virulencia, concuerda con resultados obtenidos con anterioridad, en los cuales se demuestra que la cepa mutante *phoP* es deficiente en la supervivencia dentro de células epiteliales CHO (Barchiesi *et al.*, 2012). En el caso de *Drosophila* podría deberse a la incapacidad de esta cepa mutante de resistir péptidos microbicidas, como fue reportado previamente (Barchiesi *et al.*, 2012).

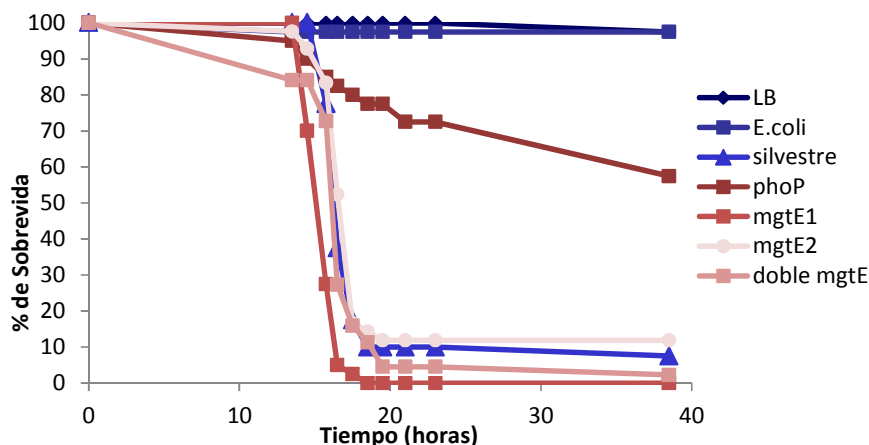


Figura 32. Invasión de distintas cepas mutantes de *S. marcescens* mediante herida séptica en *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos fueron infectados mediante herida séptica con cultivos de *S. marcescens* silvestre, *S. marcescens phoP*, *S. marcescens mgtE1*, *S. marcescens mgtE2*, *S. marcescens doble mgtE* y *E. coli* no patogénica, crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con medio LB hasta $DO_{630} = 0,1$. Se utilizó como control negativo medio LB estéril. Se muestra el promedio de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces

3 - Efecto de la aireación y temperatura de crecimiento de *S. marcescens* en un modelo de infección oral de *D. melanogaster*

En el modelo de infección oral desarrollado en el laboratorio del Dr. Ferrandon, los insectos se infectan con cultivos bacterianos crecidos durante la noche (ON, del inglés overnight) a 37°C con agitación. Se ha reportado que *S. marcescens* presenta control por temperatura en la expresión de potenciales factores de virulencia (Castelli *et al.*, 2008; McMahon *et al.*, 2012) y el modelo de invasión de células epiteliales se ha optimizado y realizado hasta el momento con cultivos crecidos ON en medio LB a 30 °C sin agitación (Fedrigo *et al.*, 2011). Por estas razones y con el objeto de evaluar la influencia de potenciales factores de virulencia cuya expresión es regulada por las condiciones de cultivo, se realizaron ensayos de supervivencia utilizando cultivos de la cepa salvaje de *S. marcescens* crecidos ON, a 30°C y 37°C con y sin agitación.

En la figura 33 A se muestran los resultados obtenidos en *D. melanogaster* A5001, en los cuales no se observan diferencias entre las infecciones realizadas con los distintos cultivos. Este resultado implicaría que los factores bacterianos diferencialmente expresados, no estarían directamente involucrados en el proceso de supervivencia en el modelo de infección oral. Otra posibilidad es que, dado que las bacterias pueden adaptarse y cambiar su programa transcripcional muy rápidamente, y que la infección intestinal de *Drosophila* ocasionada por *Serratia* ocurre en el transcurso de 20 días y a una temperatura controlada de 25 °C, la posible expresión

diferencial de factores proteicos se pierda rápidamente y, de esta manera, no sean capaces de ejercer su acción sobre el intestino de *Drosophila*.

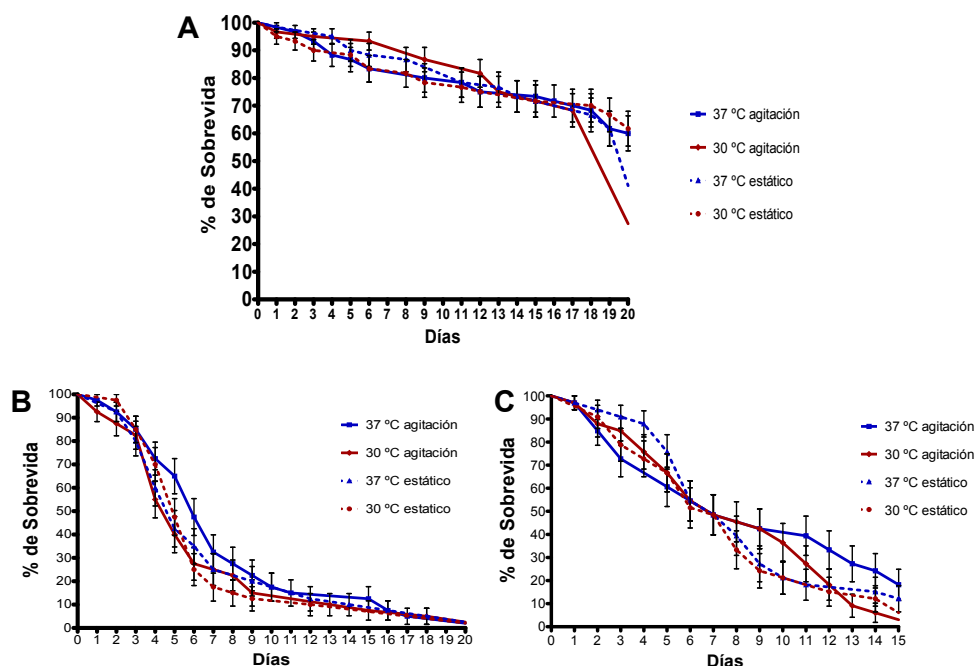


Figura 33. Análisis del efecto de la aireación y temperatura de crecimiento de cultivos de *S. marcescens* en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos silvestres A5001 (A), mutantes *kenny* (B) o insectos A5001 inyectados con latex beads (C) fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres crecidos durante 16 horas a 30 °C o 37 °C con o sin agitación, según se indique en cada caso y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió dos veces.

Dado que las bacterias pueden cambiar su programa transcripcional rápidamente, se realizó la infección en moscas *kenny* y A5001 inyectadas con partículas de látex, que mostraron ser más susceptibles a la infección de *S. marcescens* Db11 (Nehme *et al.*, 2007). En estos ensayos (figura 33 B y C) tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de supervivencia obtenidos en función del tiempo.

La suma de estos resultados permite sugerir que la infección de *D. melanogaster* es independiente de las condiciones de cultivo ensayadas (cultivos de 16 horas a 30 o 37 °C, con o sin agitación) para *S. marcescens*. Esto implicaría que en las condiciones que se realizan los ensayos de infección oral, los factores ensayados no afectarían el resultado de la infección.

4 - Caracterización de las cepas mutantes de *S. marcescens* en el modelo de infección oral

S. marcescens es una enterobacteria, patógeno oportunista en humanos. Por esta razón, el desarrollo de un modelo de infección oral, en el cual se pueda estudiar la interacción entre la bacteria y el tracto gastrointestinal, es de gran importancia para entender los mecanismos de virulencia de *S. marcescens*. La infección oral de *S. marcescens* en *D. melanogaster* A5001 se mantiene por 20 días, al fin de los cuales puede observarse la muerte de más del 50 % de las moscas infectadas. Tomando estos valores como referencia y siguiendo el número de moscas sobrevivientes diariamente se realizó el ensayo a modo de testear la capacidad patogénica de las diferentes cepas mutantes de *S. marcescens*.

En la figura 34 se muestran las curvas de sobrevivencia de distintas cepas mutantes de *S. marcescens*. En la misma se puede observar, que todas las cepas mutantes ensayadas son menos virulentas que la cepa salvaje, sin embargo los valores de los parámetros estadísticos son distintos entre cepas. Las mutantes *phiAB*, *wecD* y *wecG* presentan las mayores diferencias con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el modelo de herida séptica, donde las mutantes *wecD* y *wecG* también mostraron ser menos virulentas que la cepa salvaje, por lo que se podría sugerir que los mismos factores afectados en estas mutantes, como la estructura del ECA o la activación de RcsB, serían necesarios para la virulencia en ambos modelos de infección. Asimismo, dado que estas mutantes representan un estado activado del sistema RcsB, por lo que los factores regulados por este factor transcripcional podrían ser los responsables de esta disminución de la virulencia.

A diferencia de los resultados obtenidos en el ensayo de herida séptica, la mutante en la fosfolipasa *phiAB* mostró ser menos virulenta que la cepa salvaje en el modelo de infección oral (figura 34), lo que implicaría un rol de esta fosfolipasa en la infección intestinal de *Drosophila*. Estos resultados difieren a los obtenidos en el modelo de células CHO, donde no se encontraron diferencias en la adherencia, invasión o replicación de esta cepa con respecto a la cepa salvaje (Fedrigo *et al.*, 2011).

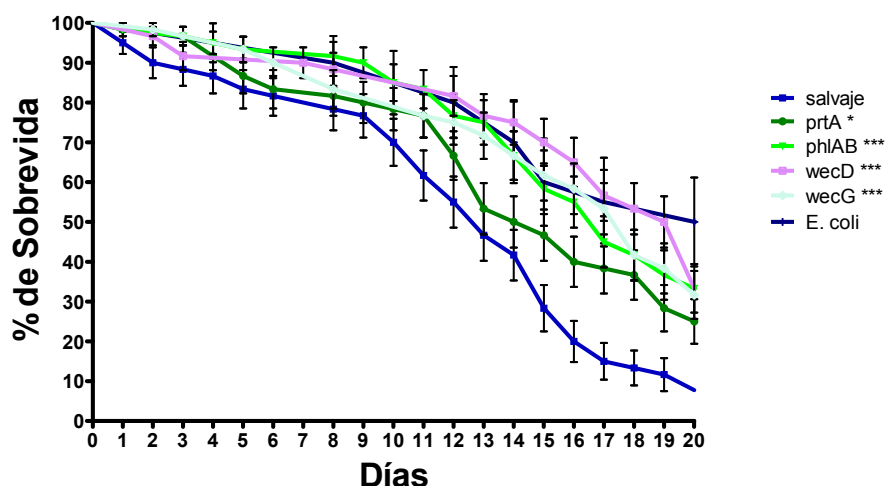


Figura 34. Invasión de *S. marcescens* salvaje y cepas mutantes en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos silvestres A5001 fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres, *prtA*, *phlAB*, *wecD*, *wecG* y *E. coli* crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces. *= $p < 0,04$ y ***= $p < 0,0001$.

Dados los resultados obtenidos con la mutante *shlB* en el modelo de células epiteliales (capítulo II de la presente tesis), que la mutante *rcsB* mostró un aumento en la virulencia en el modelo de herida séptica que podría estar mediado por la sobreexpresión de hemolisina y que el fenotipo de las mutantes *wec* en *Drosophila* podría estar mediado por la activación de RcsB, se decidió realizar la infección en insectos A5001 con las cepas *shlB* y *rcsB*. Como se muestra en la figura 35 y al igual que en los ensayos de herida séptica, la mutante *rcsB* mostró ser más virulenta que la cepa salvaje. Al igual que en el modelo de herida séptica, esto podría deberse a la acción en conjunto de los factores de virulencia que RcsB regula. Como se comentó anteriormente, este aumento en la virulencia podría ser causado por la acción de la hemolisina, ya que en esta cepa bacteriana se evidenció un aumento en la transcripción en el operón *shlBA* y en la actividad hemolítica (Di Venanzio, G; Stepanenko, T y García Vescovi E, manuscrito enviado para su publicación).

La cepa *shlB* no presentó diferencias en la supervivencia de *D. melanogaster* con respecto a *S. marcescens* silvestre (figura 35). Este resultado, al igual que el mostrado en los ensayos de herida séptica, sugerirían que en los modelos y condiciones ensayadas, la hemolisina ShlA no estaría involucrada en los mecanismos de virulencia de *S. marcescens* en *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, dado que en otros modelos de infección como *C. elegans* y ratones (Hertle & Schwarz, 2004; Kurz *et al.*, 2003), al igual que en modelo de células CHO, presentado en el capítulo II de la presente tesis, se ha demostrado la importancia de la expresión de ShlA en la

patogénesis de *S. marcescens* no se puede descartar su rol en la virulencia. Además, tampoco se puede descartar su papel en el aumento de virulencia de la mutante *rscB* en ambos modelos de infección de *Drosophila*, ya que como se mencionó anteriormente, esta cepa posee al menos el doble de actividad hemolítica que *S. marcescens* silvestre (Di Venanzio, G; Stepanenko, T y García Véscovi E, manuscrito enviado para su publicación).

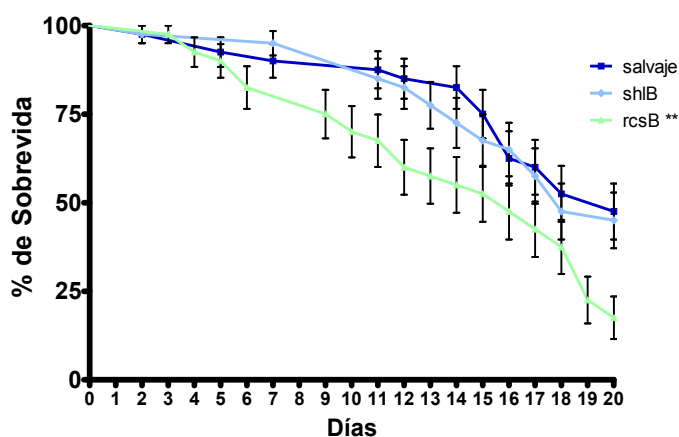


Figura 35. Análisis del desempeño de *S. marcescens* salvaje y cepas mutantes en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos salvajes fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres, *S. marcescens shIB* y *S. marcescens rcsB* crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces. **= $p < 0,001$.

Trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que, cepas mutantes en la biosíntesis del flagelo eran incapaces de adherirse y por lo tanto de invadir células CHO (Fedrigo *et al.*, 2011). Por esta razón decidió evaluarse la capacidad patogénica de las cepas *flhD* y *fliA* en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*, utilizando insectos A5001 salvajes (Figura 36 A) e insectos A5001 que fueron inyectados con partículas de látex, con el fin de bloquear la capacidad fagocítica de los hemocitos (Figura 36 B). *FlhDC* es el regulador maestro de la cascada flagelar y *FliA* es un regulador de clase II, que promueve la expresión de las proteínas asociadas al gancho, las proteínas motoras *MotA* y *MotB* y la proteína que forma el filamento, flagelina (McCarter, 2006). Como puede observarse en la figura 36 sólo la cepa *fliA* y no la cepa *flhD*, demostró ser menos virulenta que *S. marcescens* salvaje. La diferencia de comportamiento entre cepas es bastante inusual, ya que ambos reguladores controlan la misma vía de biosíntesis, es más, dado que *flhD* es un regulador transcripcional de mayor jerarquía, la biosíntesis del flagelo y la expresión de *FliA* se encuentra totalmente inhibida en esta cepa, mientras que en la cepa *fliA* se hayan ausentes los productos proteicos de los genes de clase III pero se pueden encontrar los productos de la expresión de los genes de clase II, los cuales forman el

cuerpo basal del flagelo (McCarter, 2006). Estos resultados sugerirían un rol de FliA independiente de la cascada flagelar.

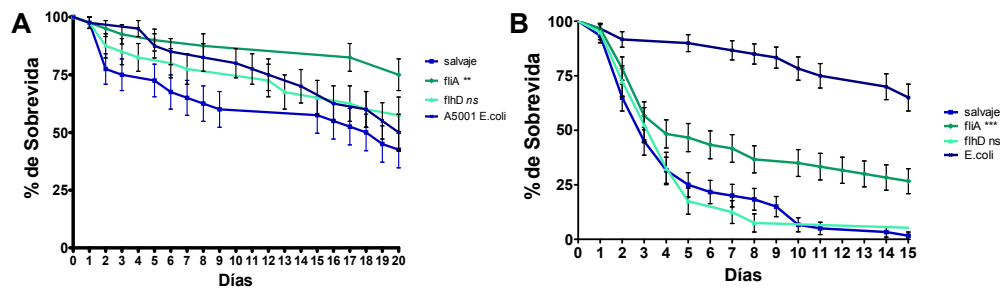


Figura 36. Invasión de *S. marcescens* salvaje y cepas mutantes en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos silvestres A5001 (A) e insectos silvestres inyectados con partículas de látex (B) fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres, *S. marcescens fliA*, *S. marcescens fliD* y *E. coli* crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces. **= $p < 0,002$ y ***= $p < 0,0001$.

A continuación, se decidió evaluar los niveles de virulencia de las mutantes *phoP*, *mgtE1*, *mgtE2* y *doble mgtE*. Como se mencionó anteriormente, la mutante *phoP* es incapaz de sobrevivir dentro de las células epiteliales (Barchiesi *et al.*, 2012). En el modelo de herida séptica la cepa *phoP* demostró ser menos virulenta que la cepa salvaje. Se decidió evaluar también las mutantes *mgtE*, ya que esta reportado que en *Pseudomonas aeruginosa*, *mgtE* está involucrada en el control de la expresión de factores de virulencia dependientes del sistema de secreción de tipo III (Anderson *et al.*, 2010a), y su transcripción es dependiente de PhoP/PhoQ (Barchiesi *et al.*, 2012). Como se muestra en la figura 37 todas las cepas ensayadas mostraron un menor grado de virulencia que la cepa salvaje en la infección de insectos A5001. Las diferencias en virulencia entre las cepas mutantes y salvaje son estadísticamente significativas para todas las cepas ensayadas.

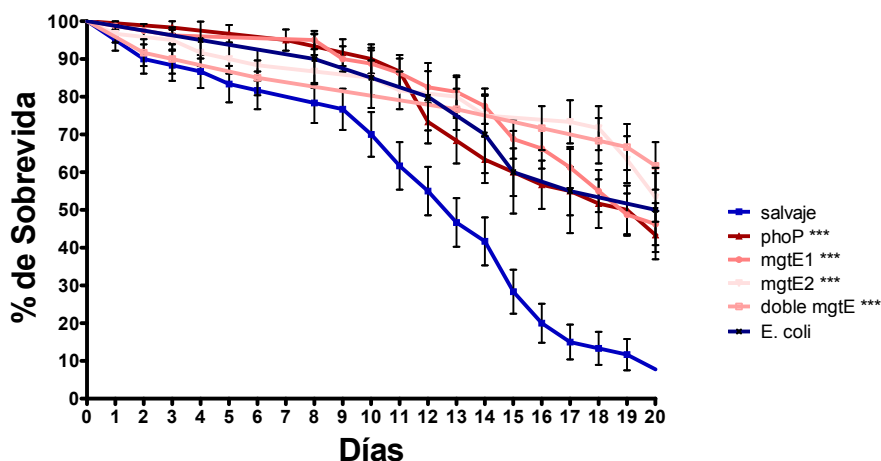


Figura 37. Invasión de *S. marcescens* salvaje y cepas mutantes en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*. Grupos de 40 insectos silvestres A5001 fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres, *S. marcescens phoP*, *S. marcescens mgtE1*, *S. marcescens mgtE2*, *S. marcescens doble mgtE* y *E. coli* crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la sobrevida de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces. ***= $p < 0,0001$.

La infección oral también se realizó en insectos *kenny*, deficientes en la vía de defensa IMD y que por lo tanto son incapaces de montar una respuesta inmune completa ante la infección de *S. marcescens*. La figura 38 muestra que en el entorno genético de estos insectos se obtuvieron los mismos resultados que con los insectos silvestres. Sin embargo, los valores de los parámetros estadísticos que evalúan las diferencias de sobrevida obtenidas con las mutantes *phoP* y *mgtE2* con respecto a la cepa silvestre no fueron iguales entre los dos entornos genéticos de *Drosophila* ensayados ($p=0,04$ y $0,001$, respectivamente). Esto podría deberse a que como se mencionó anteriormente, la incapacidad de montar una respuesta inmune completa que poseen los insectos mutantes, los hace más susceptibles a la infección por *S. marcescens* (Nehme *et al.*, 2007), incluso más susceptibles a cepas que mostraron un menor grado de virulencia en *Drosophila* salvaje.

Como se mencionó anteriormente la mayor susceptibilidad de la cepa *phoP* a los mecanismos de eliminación montados por *Drosophila* podrían deberse a la mayor susceptibilidad que esta cepa posee ante la acción de distintos AMPs (Barchiesi *et al.*, 2012). Sin embargo, dado que esta cepa continúa siendo avirulenta en insectos *kenny* incapaces de activar la vía IMD del sistema inmune y por lo tanto de producir AMPs, otros mecanismos bacterianos, controlados por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ serían requeridos para la patogenicidad de *S. marcescens*. En el caso de las mutantes *mgtE1*, *mgtE2* y *doble mgtE*, se observa el mismo comportamiento que con la cepa *phoP*, lo cual permitiría sugerir que el transporte de Mg^{+2} regulado por

estos canales podría mediar la resistencia a AMPs o los otros mecanismos controlados por PhoP/PhoQ necesarios para la virulencia.

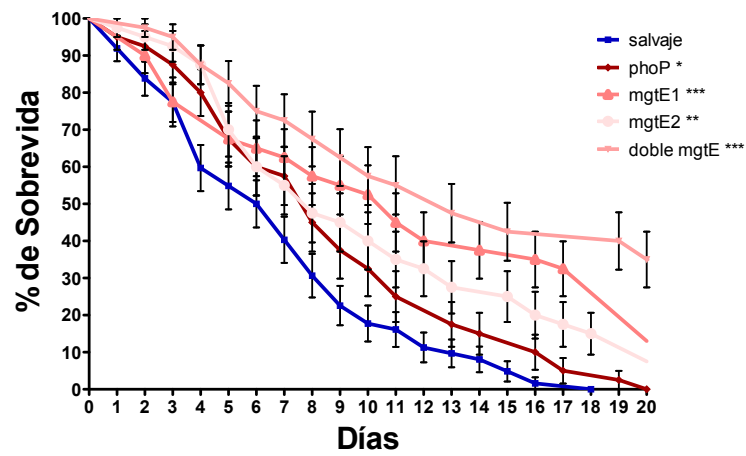


Figura 38. Análisis del desempeño de *S. marcescens* salvaje y cepas mutantes en el modelo de infección oral de *D. melanogaster*, en una mutante en la vía IMD. Grupos de 40 insectos mutantes *kenny* fueron infectados mediante vía gástrica con cultivos de *S. marcescens* silvestres, *S. marcescens phoP*, *S. marcescens mgtE1*, *S. marcescens mgtE2*, *S. marcescens doble mgtE* y *E. coli* crecidos durante 16 horas a 37 °C con agitación y diluidos con sacarosa 50 mM hasta $DO_{630} = 1$. Se muestra el promedio y desvío estándar de la supervivencia de 40 moscas. El ensayo se repitió tres veces. * = $p < 0,04$; ** = $p < 0,001$ y *** = $p < 0,0001$.

CONCLUSIONES

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

- En el modelo de herida séptica, ambas cepas de *S. marcescens*, salvaje y Db11 tendrían un comportamiento análogo y por lo tanto, en las condiciones ensayadas, sus mecanismos de virulencia serían similares.
- En el modelo de herida séptica las cepas mutantes *wecD*, *wecG* y *phoP* mostraron ser menos virulentas que *S. marcescens* salvaje, lo que implicaría una mayor susceptibilidad al sistema inmune celular y a la acción de AMPs. Esto podría darse por las alteraciones del ECA y, en el caso de *phoP*, a su incapacidad de resistir la acción de AMPs (Barchiesi *et al.*, 2012).
- La infección de *D. melanogaster* mediante vía oral, es independiente de las condiciones de cultivo de *S. marcescens* ensayadas y de los potenciales factores de virulencia diferencialmente expresados. Esto podría indicar que las bacterias se adaptan rápidamente a las condiciones medioambientales del hospedador en el curso de la infección oral.
- En el modelo de infección oral en *D. melanogaster* A5001, las cepas *phiAB*, *wecG* y *wecD* mostraron un menor grado de virulencia que la cepa salvaje. Al igual que en la infección mediante herida séptica, una posibilidad es que, la menor virulencia de las mutantes *wec* se deba a que las alteraciones en la estructura del ECA las hagan más susceptibles a los ataques del sistema inmune. Dado que *PhIA* no es necesaria para la virulencia en el modelo de herida séptica, se puede especular que es necesaria para atravesar la pared intestinal.
- La mutante *rscB* mostró un mayor grado de virulencia en el modelo de herida séptica e infección oral, el cual podría deberse a la sobreexpresión de hemolisina, aunque no se puede descartar la acción de los otros potenciales factores regulados por el sistema Rcs.
- La mutante en la biosíntesis del flagelo *fliA*, pero no la mutante *flhD*, mostró un menor grado de virulencia en *D. melanogaster*. La diferencia de comportamiento entre cepas es bastante inusual, ya que ambas controlan la misma vía de biosíntesis e implicaría un rol de *FliA* independiente de la vía flagelar.
- *S. marcescens phoP*, *mgtE1*, *mgtE2* y *doble mgtE* presentaron un menor grado de virulencia en relación a la cepa salvaje en insectos A5001 y *kenny*. En el caso de la cepa *phoP*, la disminución de la virulencia estaría mediada por la

susceptibilidad a los AMPs, conjuntamente con otros factores no identificados, cuya regulación podría depender de la función de los transportadores MgtE1 y MgtE2.

DISCUSIÓN

Resultados anteriores de este laboratorio, permitieron demostrar que *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial e induce el proceso de autofagia desde el espacio extracelular, probablemente a través de la hemolisina, ya que, la expresión heteróloga de la hemolisina ShIA de *S. marcescens* en *E. coli* W3110 es suficiente para disparar el mecanismo de autofagia en dichas células. El patógeno ingresa a la célula hospedadora contenido en una vacuola con características de endosoma o fagosoma temprano, que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3). Una población mayoritaria de las bacterias intracelulares se replica rápidamente y una población estable se mantiene hasta los 480 min p.i.. *S. marcescens* es un patógeno oportunista capaz de subvertir el proceso de autofagia celular, y de encontrar en autofagosomas un nicho apropiado donde persistir y replicarse en el interior de la célula hospedadora (Fedrigo, 2010; Fedrigo *et al.*, 2011).

En la presente tesis, se demostró que *Serratia* es capaz de invadir y proliferar en distintas líneas celulares epiteliales y de fibroblastos y de disparar una respuesta autofágica en estas células desde el medio extracelular (Figura 9). Estos resultados demuestran, que *Serratia* es capaz de interactuar con otras líneas celulares, donde puede establecer un nicho replicativo y que, por lo tanto, los resultados anterioremente obtenidos no se limitan al modelo de infección en células CHO.

Luego de la invasión, la autofagia es un componente clave de la defensa innata del hospedador al cual la bacteria debe enfrentar. El destino canónico de las bacterias intracelulares marcadas por la vía autofágica es la degradación, ya que la vesícula autofágica conteniendo la carga no deseada se fusiona con el lisosoma, formando un autolisosoma. Sin embargo, y como se mencionó en la introducción general, numerosos patógenos exhiben sofisticadas estrategias para evadir, impedir o incluso manipular la progresión del proceso autofágico normal con el fin de establecer una infección resistente. Por citar un ejemplo, después de la internalización, *Staphylococcus aureus* reside dentro del fagosoma que es luego rodeado por membranas autofágicas. Las bacterias modulan la maduración del autofagosoma, impidiendo la acidificación y la fusión con los lisosomas. Más tarde, *S. aureus* escapa de estas vacuolas hacia el citosol de la célula hospedadora, probablemente con la contribución de la acción de la α -hemolisina (Mostowy & Cossart, 2012). De hecho, se ha demostrado que la α -hemolisina de *S. aureus* es requerida para la activación de la

vía autofágica en las células infectadas (Mestre *et al.*, 2010). De manera notable, en los últimos años se ha acumulado evidencia de que, durante la invasión, distintas poblaciones de bacterias internalizadas pueden interaccionar de manera diferencial con las distintas vías del tráfico vesicular, lo que resulta en distintos destinos para las distintas poblaciones. El trabajo de Birmingham y colaboradores provee evidencia de que coexisten por lo menos cuatro poblaciones intracelulares distintivas de *Salmonella entérica*: bacterias que residen y proliferan en un compartimento endosomal modificado evitando la maduración del mismo, una población en la cual la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella*-containing vacuole) es dañada por la acción de efectores bacterianos promoviendo la progresión a endolisosomas degradativos o siendo blanco del sistema autofágico, y una última población que es capaz de escapar de las SCV dañadas al citosol (Birmingham & Brumell, 2006).

En la infección de *Serratia*, se evidenció la detención de los eventos de fusión de las SeCV con los compartimentos endosomales tardíos y/o lisosomales, ya que un estimado del 89 +/- 4% del total de SeCV que colocalizan con el marcador autofágico LC3, no colocalizaron ni con el marcador acidotrópico LysoTracker ni con DQ-BSA, inclusive a tiempos tardíos de la infección. Por lo tanto, la progresión esperada a un autofagolisosoma funcional fue de alguna manera bloqueada o retrasada en una población mayoritaria de las bacterias intracelulares. Además, estos resultados implican que *Serratia* es capaz de ocupar un nicho donde la acción adversa del pH ácido y las enzimas líticas son evadidas. Recientemente, hemos demostrado que el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ se encuentra involucrado en los mecanismos que mediarían la inhibición de la maduración de la SeCV, evitando así, un medio ácido y degradativo (Barchiesi *et al.*, 2012).

En los ensayos de inhibición-neutralización de la acidificación vacuolar realizados en la presente tesis, se demostró que eventos tempranos en el proceso de invasión de *Serratia* se encuentran inhibidos en estas condiciones, lo cual se evidenció por las bajas UFC intracelulares recuperadas desde tiempos muy tempranos en la invasión. Esto podría sugerir que, un factor bacteriano que requiere un pH bajo para su actividad intracelular podría estar involucrado en estos eventos. En este contexto se ha demostrado que diversas toxinas bacterianas que son internalizadas en la célula hospedadora mediante endocitosis mediada por receptor, requieren la acidificación del medio para su procesamiento y activación, y este efecto se evita mediante el tratamiento con Bafilomicina A1 o NH₄Cl (Qa'Dan *et al.*, 2000; Umata *et al.*, 1990). Otra posibilidad es que la inhibición de la acidificación impidiera o alterara el recambio

de receptores eucariotas necesarios para la internalización de la bacteria, la conformación de proteínas o la afinidad entre ligados y receptores necesarios para la invasión (Dröse & Altendorf, 1997).

Como se mencionó anteriormente, *Serratia* es capaz de residir en una vacuola de características autofágicas, la cual forma un nicho propicio para su replicación. A fin de caracterizar esta vacuola, en la presente tesis se realizaron ensayos de inducción e inhibición de la autofagia. A diferencia del resultado esperado, cuando se indujo la autofagia mediante el hambreado de las células CHO, no se observó un aumento de la sobrevivencia intracelular de *Serratia*. Es notorio, que el proceso autofágico disparado por *Serratia* involucra a casi todas las células desafiadas en el ensayo de invasión y lleva a la formación de estructuras autofágicas mucho más grandes que las que se observan en la autofagia disparada por hambreado (Figura 16), lo que podría sugerir que habría dos etapas de inducción del proceso autofágico y que estas dependerían de mecanismos diferentes. Es más, el bloqueo de la activación del proceso autofágico disparado por *Serratia* mediante la acción de los inhibidores de la PI3K wortmanina y 3-metiladenina fue inefectivo, a pesar que esta inhibición disminuyó drásticamente los niveles de UFC intracelulares recuperadas al ser adicionado antes del inóculo, con la intención de bloquear el proceso disparado extracelularmente. La wortmanina fue capaz de bloquear el proceso autofágico disparado por el hambreado de las células, pero fue incapaz de inhibir el proceso disparado por *Serratia*. El efecto general de la wortmanina es inhibir el proceso autofágico mediante la inhibición de las PI3Ks de clase III, las cuales actúan luego de las PI3Ks de clase I en el proceso autofágico. Las PI3Ks se encuentran involucradas en otros procesos de tráfico de membranas, que incluyen la formación de copas fagocíticas y micropinosomas y la producción de PI3P en la membrana de endosomas tempranos con el fin de reclutar proteínas efectoras que regulan el acoplamiento de las vesículas y en la clasificación del cargo (Jaber & Zong, 2013). Además, el agregado de wortmanina luego de la internalización de *Serratia*, no provocó ningún cambio en el resultado de la infección. Teniendo en cuentas esto, se podría especular que la PI3K estaría involucrada en el proceso de internalización o eventos muy tempranos en la invasión de *Serratia*. Entonces, los resultados de esta tesis permiten sugerir que a) *Serratia* es internalizada en las células CHO por un proceso que requiere la actividad de la PI3K y b) que el proceso autofágico inducido por *Serratia* no requiere PI3K. De manera interesante, Mestre y colaboradores (Mestre *et al.*, 2010) demostraron que en la infección de *Staphylococcus aureus*, la activación del proceso autofágico dependiente de la α -toxina es independiente de la actividad PI3K. Además, en el trabajo de Kageyama y

colaboradores (Kageyama *et al.*, 2011) se mostró que LC3 y el complejo Atg16L son reclutados a las estructuras de membrana de tipo autofágicas que rodean a *Salmonella* dentro de la SCV, de una forma PI3K independiente.

Como se mencionó en la introducción general, el complejo formado por un grupo de proteínas Atg, que incluye a Atg5-Atg12 y Atg16 se recluta al autofagosoma y permite la subsiguiente lipidación y reclutamiento de LC3 a las membranas de los autofagosomas (Kabeya *et al.*, 2000). Cuando se realizó el ensayo de invasión utilizando la línea de fibroblastos murinos mutantes *atg5^{-/-}*, se inhibió completamente la internalización y proliferación intracelular de *Serratia*. Este resultado demuestra que la maquinaria autofágica es necesaria para asegurar la propagación intracelular de la bacteria y que Atg5 es necesario para el disparo de autofagia inducido por *Serratia*.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir que la vía autofágica posee un rol crítico en la sobrevivencia y proliferación de *Serratia* dentro de las células epiteliales. Además *Serratia* activa un proceso autofágico no canónico que permite la generación de vacuolas especializadas que mantienen la vida intracelular de esta bacteria. Una vez dentro de la SeCV, la bacteria evita o retrasa la interacción con los lisosomas. Como consecuencia de esto, *Serratia* altera la progresión del autofagosoma, construyendo un ambiente propicio para su sobrevivencia y proliferación. Como se mencionó anteriormente, resultados previos del laboratorio mostraron que la expresión heteróloga de ShIA en una cepa de *E. coli* no invasiva le otorgó a esta bacteria la capacidad de disparar el proceso autofágico desde el medio extracelular.

En el presente trabajo de tesis, ensayos de invasión realizados con una mutante de *Serratia* incapaz de activar y secretar la hemolisina ShIA inhibió la capacidad de la bacteria de disparar el fenotipo autofágico desde el medio extracelular. El hecho de que la autofagia sea inducida extracelularmente por bacterias capaces de expresar hemolisina se vio reforzado por la observación que el fenotipo autofágico disparado en células CHO no-invasadas se perdió tan pronto como las bacterias extracelulares metabólicamente activas se eliminaron mediante la acción de gentamicina. Sin embargo, se pudo comprobar que el reclutamiento de LC3 desde el espacio intracelular a la SeCV, sería independiente de ShIA (Figura 20 B). Entonces, los resultados de esta tesis indican que cuando *Serratia* se encuentra con la célula eucariota, la inducción del proceso autofágico ocurriría en dos etapas. La interacción temprana expone a la célula epitelial a la acción de la toxina formadora de poros ShIA. El desbalance metabólico generado por el daño causado por ShIA promovería la respuesta autofágica observada en la gran mayoría de las células. Un porcentaje de

estas células son luego efectivamente invadidas por *Serratia*. Anteriormente se ha demostrado que luego de la internalización *Serratia* establece una vacuola que recluta marcadores autofágicos, LC3 y Rab7 (Fedrigo *et al.*, 2011). En esta tesis se demuestra que la internalización y el reclutamiento de LC3 a la SeCV no dependen de la acción de ShIA. Sin embargo, no se puede asegurar que las SeCV obtenidas con la cepa salvaje posean idénticas características que las vacuolas que alojan la cepa mutante *shIB*.

La bibliografía reciente apoya la hipótesis de que bacterias patógenas que residen y/o proliferan dentro de vacuolas intracelulares, como *Shigella*, *Listeria* o *Salmonella*, inducen la respuesta autofágica al afectar el metabolismo celular. Este disparo se logra a través de la depleción de las reservas de aminoácidos intracelulares que provoca la inhibición de la quinasa mTOR, que a su vez resulta en una activación del proceso autofágico. De manera interesante Tattoli y colaboradores demostraron que el daño aséptico a la membrana plasmática o lisosomas del hospedador es suficiente para disparar las vías de hambre de aminoácidos, pero sólo el daño en los lisosomas provocó la inhibición de mTOR, lo que implica que esta vía sólo es activada por las bacterias dentro de compartimentos intracelulares. Es más, los efectores de *Listeria* y *Salmonella* responsables de la inducción de la autofagia son a su vez responsables de dañar la membrana de la vacuola que contiene a las bacterias: LLO y factores dependientes de SPI-1, respectivamente (Tattoli *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha acumulado evidencia que involucra a las proteínas formadoras de poros, como ShIA, en la activación de la maquinaria autofágica. Algunos ejemplos son la citotoxina de *Vibrio cholera* (VCC), que activa el proceso autofágico desde fuera de las células y al sobreexpresarse en células CHO (Gutierrez *et al.*, 2007), la toxina vacuolizante VacA de *Helicobacter pylori* promueve la autofagia en células epiteliales gástricas humanas (Terebiznik *et al.*, 2009) y la LLO de *Listeria monocytogenes* es necesaria y suficiente para promover el disparo de autofagia cuando es liberada dentro de los macrófagos, generando fagosomas espaciosos no acídicos y no degradativos (SLAPs) en los que el patógeno replica (Birmingham *et al.*, 2007, 2008; Eckhardt *et al.*, 1999; Meyer-Morse *et al.*, 2010) Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la proteína formadora de poros α -hemolisina (Hla) secretada por *S. aureus* participa en la activación de la vía autofágica (Mestre *et al.*, 2010). Estos hallazgos permiten sugerir que las PFTs poseen un rol central en el control del balance entre el daño celular ocasionado por el patógeno y la respuesta autofágica disparada por el hospedador. El nexo entre la acción de las PFTs y el

disparo de autofagia, se puede encontrar, por ejemplo, en el trabajo de Kloft y colaboradores, quienes demostraron que en líneas celulares epiteliales expuestas a distintos tipos de toxinas formadoras de poros purificadas (α -toxina de *Staphylococcus aureus*, citolisina de *Vibrio cholerae*, streptolisina O y hemolisina de *E. coli*) se activan distintas vías de señalización que culminan en el disparo de autofagia (Kloft & Neukirch, 2010). Gonzalez y colaboradores apoyaron estos descubrimientos al obtener resultados análogos con la LLO de *Listeria monocytogenes* y la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (Gonzalez *et al.*, 2011). En suma, estos resultados demuestran que la disminución del índice ATP/AMP celular, el aumento en el eflujo de K^+ y la depleción de aminoácidos causadas por la disrupción de la membrana plasmática son las señales capaces de inducir la vía autofágica mediante la activación de diferentes vías de señalización. Esta inducción podría contribuir a un estado quiescente que favorecería la recuperación de la homeostasis y la reparación de la membrana de la célula dañada (von Hoven *et al.*, 2012).

Los resultados de esta tesis demuestran que *Serratia marcescens* puede disparar una cascada autofágica no canónica desde fuera de la célula epitelial, previo al proceso de internalización. Además, se identificó a la exoproteína ShIA como el factor bacteriano responsable de esta inducción, el primer factor exportado por un sistema de secreción de tipo dos compañeros capaz de disparar el proceso autofágico en las células eucariotas. Previamente, Hertle y colaboradores mostraron que ShIA induce depleción de ATP y eflujo de potasio en células epiteliales y fibroblastos (Hertle, 2000; Hertle *et al.*, 1999), señales que, como fue descrito anteriormente, son capaces de activar la vía autofágica.

El proceso de invasión descrito en la presente tesis para la cepa mutante *shIB*, permitiría sugerir que en los eventos de internalización y replicación temprana de *Serratia* en las células CHO, la hemolisina no sería un factor indispensable. Sin embargo, a tiempos tardíos de la invasión se pudo comprobar un gran aumento de las UFC intracelulares en la cepa *shIB*, que se correlaciona con la detección de bacterias en el espacio extracelular, proceso dependiente de la expresión de hemolisina activa. Esos resultados demostrarían un rol de ShIA en el proceso de salida y diseminación de *Serratia* de la célula hospedadora. Previamente, se ha reportado el rol de las PFTs en la ruptura de las vacuolas intracelulares que poseen bacterias, como en el caso de *Listeria* y *Shigella*, lo que permite la liberación de las bacterias al citoplasma de las células y su posterior diseminación a células vecinas (Mostowy & Cossart, 2012). Además, en una revisión reciente de Los y colaboradores (Los *et al.*, 2013) se muestra

que distintas PFTs se encuentran involucradas en los procesos de diseminación de las bacterias en modelos animales. Por ejemplo, en un modelo de bacteremia en conejo mediante inyección intravenosa de *S. aureus*, se demostró que PVL (leucocidina Panton-Valentine) es necesaria para la dispersión de las bacterias en el riñón, pero no para el crecimiento bacteriano. Mutantes de *M. tuberculosis* en ESAT-6 y CFP-10 poseen una disminuida colonización de los pulmones, en un modelo de ratón con infección intratraqueal. En el caso de *Serratia*, no se pudo evidenciar pasaje de la bacteria por el citoplasma de la célula hospedadora, aunque se demostró la localización de galectina 8 en la SeCV a tiempos tardíos en la infección, proceso dependiente de la expresión de ShIA activa. Como se mencionó anteriormente, las galectinas se unen a glicoconjugados que poseen β -galactósidos y, la ausencia de los mismos en el citosol y su presencia en la cara luminal de las vesículas, implica que la unión de galectina sólo puede darse ante el daño en la membrana de estos compartimentos. Además, se demostró que galectina 8 monitorea la integridad endosomal y lisosomal y detecta la invasión bacteriana al unirse a glicanos que son expuestos en las vesículas dañadas que contienen a *Salmonella*, *Listeria* o *Shigella* y que detecta el daño estéril en endosomas y lisosomas (Thurston & Wandel, 2012). La suma de estos resultados permitiría sugerir que, a través del daño ocasionado en la membrana de la SeCV, la hemolisina estaría regulando el proceso de salida de *Serratia*, mediante un mecanismo que no involucraría liberación de bacterias al citoplasma de la célula hospedadora ni permeabilización de la membrana plasmática.

D. melanogaster es una especie utilizada recurrentemente en experimentación dado que posee un reducido número de cromosomas, su genoma se encuentra secuenciado, posee un tiempo de generación corto, la estructura de sus órganos son simples pero análogas a la de mamíferos y se puede expandir su número a muy bajo costo. Además, este organismo modelo es hospedador de una sorprendente variedad de patógenos fúngicos, bacterianos y virales, y las infecciones humanas sistémicas o intestinales pueden ser mimetizadas fácilmente en *Drosophila* a través de ensayos de herida séptica o infección oral, respectivamente (Panayidou *et al.*, 2014). *S. marcescens* es un potente patógeno de *Drosophila*. En un modelo de herida séptica, a pesar de que se induce una respuesta inmune fuerte y sistémica, las bacterias son resistentes a los AMPs y las moscas sucumben ante la masiva proliferación de las bacterias en la hemolinfa. De manera interesante, las moscas no sucumben en un modelo de infección oral con *S. marcescens*, a pesar de que un número bajo pero significativo de bacterias es recuperado de la hemolinfa de las moscas unas pocas horas post-infección, lo que sugiere que *Serratia* es capaz de cruzar rápidamente la

barrera intestinal (Nehme *et al.*, 2007). Es por estas razones que *Drosophila* resulta un muy buen modelo para evaluar la contribución de potenciales factores de virulencia de *Serratia* en infecciones sistémicas o intestinales, que mimetizan mejor las características de una infección en pacientes humanos que el modelo de células en cultivo. Además, dado que *Drosophila* carece de un sistema inmune adaptativo, el rol del sistema inmune innato se puede estudiar de forma más clara y sin interferencias.

El sistema PhoP/PhoQ es un sistema de dos componentes ampliamente conservado en muchas bacterias patogénicas y no patogénicas. Este sistema controla la homeostasis de magnesio, y en bacterias patógenas gobierna la expresión de fenotipos cruciales para la virulencia. A pesar del hecho de que en *Salmonella entérica*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Yersinia pestis* el sistema PhoP/PhoQ confiere capacidad de sobrevivir dentro del hospedador, el conjunto de genes regulados y por lo tanto, los mecanismos activados, varían entre las distintas especies de bacterias patógenas. Recientemente, nuestro laboratorio demostró que en *S. marcescens* el sistema PhoP/PhoQ le confiere a la bacteria la capacidad de resistir a la escasez de magnesio en el ambiente, pH ácido y la acción de compuestos antimicrobianos catiónicos como la polimixina B. Además, estos desafíos ambientales constituyen señales que activan el sistema. También previamente se demostró que *phoP* es activado intracelularmente y que la cepa mutante *phoP* es incapaz de sobrevivir dentro de la célula hospedadora. El sistema PhoP/PhoQ demostró no ser necesario para la internalización ni para la fusión de la SeCV con la vía autofágica, sin embargo se encuentra involucrado en evitar la fusión de la SeCV con compartimentos ácidos y degradativos (Barchiesi *et al.*, 2012). En *D. melanogaster*, tanto en el modelo de herida séptica como en el de infección oral, la cepa mutante de *S. marcescens phoP* demostró ser menos virulenta que la bacteria silvestre. Estos resultados en conjunto con los antecedentes descritos permitirían especular que en el caso de *Drosophila*, el sistema PhoP/PhoQ estaría involucrado en la resistencia a los AMPs y/o evitar la eliminación de las bacterias mediante fagocitosis por los hemocitos. En vista de que la infección oral en moscas *Kenny*, las cuales son incapaces de activar la vía de la respuesta inmune IMD y, por lo tanto, secretar AMPs, pero son competentes en el proceso de fagocitosis, la cepa mutante *phoP* también fue menos virulenta que *Serratia* salvaje, se podría hipotetizar un rol del sistema PhoP/PhoQ en evitar la eliminación mediada por fagocitosis. Sin embargo, no se puede descartar que este sistema le confiera a *S. marcescens* resistencia a los AMPs.

Las mutantes *mgtE1*, *mgtE2* y *doblemgtE* también mostraron ser menos virulentas que *S. marcescens* silvestre en el modelo de infección oral en ambos entornos génicos de *Drosophila* pero no presentaron diferencias en el modelo de herida séptica. MgtE pertenece a una familia de transportadores de iones involucrados en la regulación de la homeostásis de Mg^{+2} intracelular. Como se comentó anteriormente, en nuestro laboratorio se demostró que *mgtE1* es un miembro del regulón PhoP de *Serratia* (Barchiesi *et al.*, 2012). Mientras que, a través de análisis bioinformático se identificó una caja PhoP en el promotor de *mgtE2*. Solo unos pocos reportes le otorgan a los transportadores MgtE un rol en virulencia. La mutación de *mgtE* en *Campylobacter jejuni* y *Aeromonas hydrophila* produce defectos en las propiedades de virulencia, incluyendo la colonización de los hospedadores, formación de biofilms y motilidad tipo swarming (Kakuda & DiRita, 2006; Merino *et al.*, 2001). En *P. aeruginosa* la mutación de *mgtE* aumenta la citotoxicidad de los biofilms que se forman sobre células en cultivo. Esta mutación provoca un aumento en la expresión génica del SST3 y modula su expresión, probablemente a través de la inhibición de la transcripción dependiente de ExsA (Anderson *et al.*, 2010a). Entonces, se podría especular que dado que las cepas *mgtE1*, *mgtE2* y *doblemgtE* mostraron comportamiento similar a la cepa *phoP* en los ensayos de infección oral, los mecanismos controlados por PhoP/PhoQ que mediarían la virulencia de *Serratia* en este modelo de infección podrían ser ejercidos, al menos parcialmente por estos transportadores. Sin embargo, dado que en el modelo de herida séptica las mutantes *mgtE1*, *mgtE2* y *doblemgtE* no presentaron diferencias con respecto a la cepa salvaje, se podría especular que los mecanismos de virulencia desarrollados por *Serratia* son diferentes en ambos modelos y que los transportadores *mgtE* serían requeridos para atravesar el epitelio intestinal o en eventos anteriores al pasaje de las bacterias a la hemolinfa de *Drosophila*.

Como se mencionó anteriormente, la mutante en la fosfolipasa *phlAB* mostró ser menos virulenta que la cepa salvaje en el modelo de infección oral, lo que implicaría un rol de esta fosfolipasa en la infección intestinal de *Drosophila*. PhlA es coexpresada con los genes flagelares, y requiere del secretoma flagelar para su exporte (Castelli *et al.*, 2008; Givskov *et al.*, 1995). Se ha reportado que PhlA presenta actividad hemolítica frente a glóbulos rojos y actividad citotóxica sobre células epiteliales. En ese mismo trabajo se postula que, la liberación de lisofosfolípidos, provenientes de la hidrólisis de fosfolípidos originada por PhlA, serían los responsables de desestabilizar las membranas y originar la actividad hemolítica y citotóxica (Shimuta *et al.*, 2009). Los resultados encontrados en *Drosophila*, difieren a

los obtenidos en el modelo de células CHO, donde no se encontraron diferencias en la adherencia, invasión o replicación de esta cepa con respecto a la cepa salvaje (Fedrigo *et al.*, 2011). Se podría especular que la actividad fosfolipasa es necesaria para atravesar la barrera epitelial del intestino del insecto. Los experimentos necesarios para comprobar esta hipótesis están siendo realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Ferrandon.

Las mutantes deficientes en la biosíntesis del flagelo no presentaron diferencias con respecto a la cepa salvaje en el modelo de herida séptica. Esto implicaría que ni la motilidad ni la adherencia mediada por flagelo serían necesarias para la virulencia en un modelo de infección sistémica. Sin embargo, en el modelo de infección oral, la mutante *fliA* demostró ser menos virulenta que *Serratia* salvaje y la mutante *flhD* no mostró diferencias con la cepa salvaje. Como se mencionó en la introducción general, el promotor del operón maestro *flhDC* define la clase 1 de promotores flagelares. La transcripción de *flhDC*, es un punto de regulación crucial en el que se decide la iniciación de la biosíntesis del flagelo, ya que actúa como activador transcripcional de los promotores de clase 2 encontrados corriente arriba de los operones de clase media. Los productos proteicos de los operones de clase media incluyen proteínas necesarias para la estructura y ensamblaje del cuerpo basal del flagelo, así como también dos reguladores transcripcionales, FliA y su regulador negativo, FlgM. FlgM censa el estado de desarrollo del flagelo, cuando la estructura del cuerpo basal del gancho está completa y es, por lo tanto, competente para secretar las proteínas asociadas al gancho y las subunidades de flagelina, también se vuelve competente para secretar FlgM. Esto libera la represión sobre la expresión de los transcriptos de clase 3, que son activados por FliA. Estos genes codifican para las subunidades generadoras del torque del motor, MotA y MotB, proteínas del sistema de quimiotaxis, y las proteínas que conforman las subunidades de flagelina (Anderson *et al.*, 2010b; Patrick & Kearns, 2012). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en *Drosophila*, se podría especular la existencia de un mecanismo de virulencia dependiente de FliA e independiente de FlhD. Sin embargo, dado que la extensa bibliografía describe a FliA como un gen regulado por FlhD y autoregulado, los resultados presentados en esta tesis, implicarían un mecanismo donde la expresión de FliA ejerce funciones de modo independiente de FlhD. Además, dado que *fliA* también presentó una menor virulencia en moscas inyectadas con partículas de látex, donde se bloquea la capacidad fagocítica de los hemocitos, se podría especular que este mecanismo de virulencia mediado por FliA no estaría implicado en el proceso de resistencia a la fagocitosis.

Cepas de *S. marcescens* mutantes en componentes de la vía de síntesis del antígeno común de enterobacterias (ECA), *wecG* y *wecD* mostraron ser menos virulentas que la cepa silvestre, tanto en el modelo de herida séptica como en la infección oral. La ausencia de una estructura completa del ECA constituye una señal capaz de inducir el sistema de transducción de señales Rcs, lo que inhibe la transcripción de *flhDC* y provoca alteraciones en la capacidad móvil de la bacteria y en su habilidad de secretar fosfolipasa (Castelli & Vescovi, 2011; Castelli *et al.*, 2008). Dado que en los modelos de infección de *Drosophila* no se pudo encontrar un rol para el flagelo ni para la hemolisina en la virulencia de *Serratia*, otros factores, como la alteración estructural del ECA, la incapacidad de secretar fosfolipasa PhIA y/o la activación de RcsB serían responsables de la alteración observada en la virulencia de estas cepas. De modo interesante, la cepa *rscB* mostró ser más virulenta que la cepa silvestre, tanto en el modelo de herida séptica como en la infección oral. El sistema de dos componentes Rcs se describió originalmente en *E. coli* como un regulador de la expresión del operón *cps*, que codifica para proteínas necesarias para la producción de polisacáridos de la cápsula (Huang *et al.*, 2006). El sistema Rcs contribuye a la modificación de la superficie bacteriana en respuesta a los cambios del ambiente. Además, regula la biosíntesis del flagelo en *E. coli*, *Salmonella enterica* y *P. mirabilis*, mediante la represión del operón *flhDC*. Rcs está involucrado en la regulación de la virulencia de *S. entérica* (Huang *et al.*, 2006) y como se comentó anteriormente, en *Serratia* la mutante *rscB* presenta un mayor nivel de transcripción del operón *shIBA* y por lo tanto, de la actividad hemolítica (Di Venanzio, G; Stepanenko, T y García Vescovi E, manuscrito enviado para su publicación). Entonces, se podría especular que la hiperproducción de la hemolisina, que en la mutante *rscB* se ha determinado que es al menos dos veces mayor que en *Serratia* silvestre, es la responsable del aumento de la virulencia. Sin embargo, no se puede descartar que este fenotipo se deba a la acción de otros factores regulados por el sistema Rcs. De modo interesante, estos resultados se correlacionan indicando que tanto en su estado reprimido (*rscB*) como activado (en las cepas *wecG* o *wecD*) el regulador RcsB modula el potencial patológico de *Serratia* en este modelo de infección.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis junto a los resultados anteriores del grupo (Barchiesi *et al.*, 2012; Fedrigo *et al.*, 2011), se propone un modelo de infección de *S. marcescens* en células no fagocíticas. *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial y expresa la hemolisina ShIA, induciendo el proceso de autofagia desde el espacio extracelular (Figura 39 A). El patógeno ingresa a la célula hospedadora, mediante un proceso que requiere la PI3K,

Atg5 y posiblemente un ambiente ácido, contenido en una vacuola con características de endosoma o fagosoma temprano, que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3) (Figura 39 B). Una población mayoritaria de las bacterias intracelulares se replica rápidamente, activa la transcripción del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, contribuye a inhibir o retrasar la fusión con lisosomas (Figura 39 C). Mientras que otra población minoritaria del microorganismo no es capaz de escapar al mecanismo de defensa del hospedador y es degradado en compartimientos lisosomales (Figura 39 D). A tiempos tardíos en la invasión, la hemolisina daña la membrana de la SeCV, reclutando galectina 8 y permitiendo la diseminación extracelular de *Serratia* (Figura 39 E).

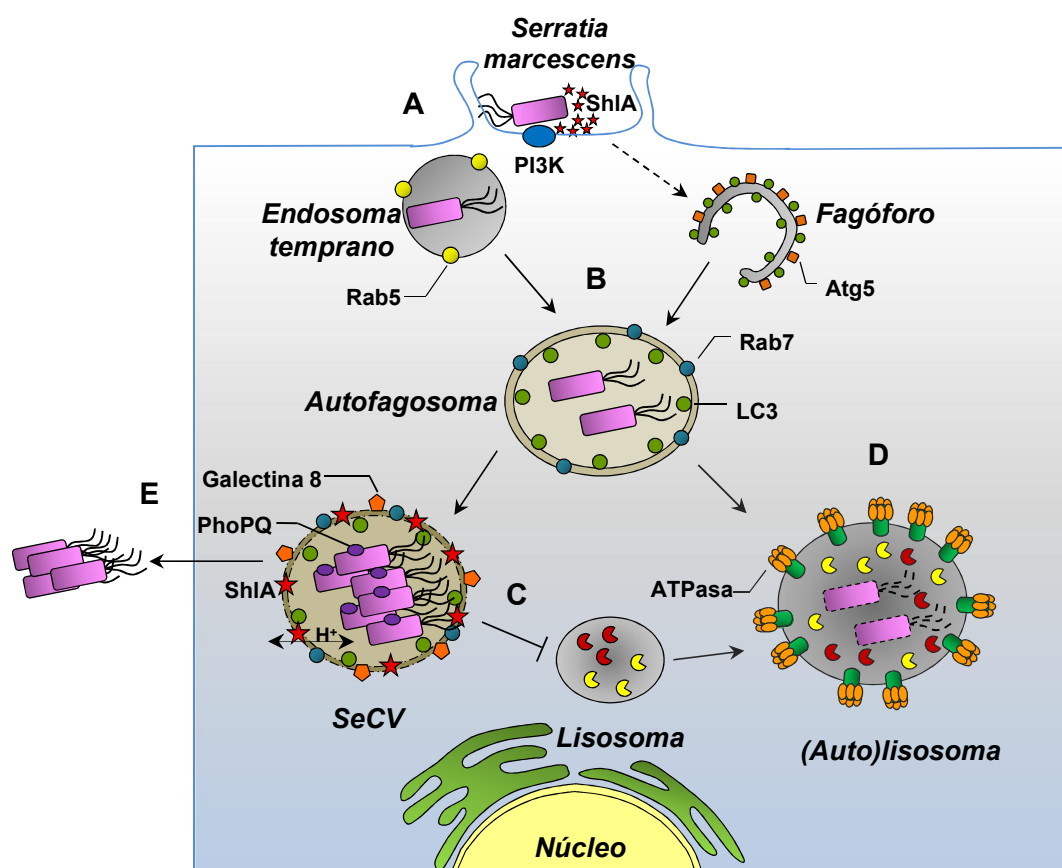


Figura 39. Modelo de Invasión de *S. marcescens* en células epiteliales. A) La bacteria requiere del flagelo para adherirse a la célula hospedadora y, a través de la expresión de ShIA, induce autofagia desde el espacio extracelular. Durante el proceso de internalización es necesaria la actividad de la PI3K. B) El endosoma o fagosoma temprano adquiere marcadores de autofagosomas. C) Una población mayoritaria del patógeno se replica en la SeCV e inhibe la fusión con lisosomas, mediante la expresión de PhoPQ. D) Otra población minoritaria de bacterias intracelulares es degradada en lisosomas. E) A tiempos tardíos en la invasión, ShIA daña la membrana de la SeCV, reclutando galectina 8 y permitiendo la diseminación extracelular de *Serratia*.

Los resultados descritos en la presente tesis, han permitido contribuir al enriquecimiento del conocimiento acerca de los mecanismos desplegados por *Serratia* para la infección, invasión celular y evasión de los sistemas de defensa del huésped.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Los procesos de invasión, replicación e inducción de la vía autofágica serían mecanismos comunes inducidos por *S. marcescens* en distintas células hospedadoras.
- ✓ La actividad de PI3K y Atg5 son requeridas para la internalización y/o en eventos tempranos de la invasión de *Serratia* a la célula epitelial.
- ✓ *S. marcescens* es capaz de manipular el tráfico vesicular canónico y evitar su eliminación de la célula hospedadora.
- ✓ Se requeriría de un ambiente con bajo pH en los procesos de internalización y/o tempranos de la invasión de *Serratia*.
- ✓ La hemolisina ShIA es responsable del fenotipo autofágico inducido por *S. marcescens* desde el espacio extracelular, pero no estaría involucrada en el reclutamiento de LC3 a la SeCV.
- ✓ ShIA, a través del daño de la membrana de la SeCV media la salida de las bacterias al medio extracelular.
- ✓ ShIA no está involucrada en la internalización ni en eventos tempranos de la invasión de *S. marcescens*.
- ✓ El sistema de transducción de señales Rcs cumple una función relevante en los mecanismos de virulencia ejercidos por *Serratia* en *D. melanogaster*.
- ✓ El sistema PhoP/PhoQ mediaría la resistencia a la acción de AMPs y a la eliminación por fagocitosis de *Drosophila*. En la infección intestinal, estos mecanismos podrían estar mediado por los transportadores MgtE.
- ✓ Las cepas *phIA* y *fliA* son atenuadas en el modelo de *D. melanogaster* indicando ser requeridas para el proceso de infección intestinal.

RESUMEN

S. marcescens es un patógeno oportunista causante de diversas infecciones nosocomiales. La incidencia de las afecciones originadas por esta bacteria ha incrementado en los últimos años debido a su capacidad de adherirse a superficies abióticas y por presentar resistencia a protocolos estándares de esterilización y desinfección. Asimismo, *S. marcescens* es capaz secretar varias exoproteínas, que han sido implicadas en la virulencia de este patógeno. Dentro de estos potenciales factores de virulencia, la hemolisina ShIA es el más extensamente descrito. La hemolisina es codificada por el operón *shIBA* y transportada mediante el sistema de dos compañeros. Cepas mutantes en ShIA mostraron ser menos virulentas en modelos de líneas celulares, *C. elegans*, *D. melanogaster* y ratones. Sin embargo, aún no se ha dilucidado cómo estos factores contribuyen a la capacidad adaptativa de la bacteria para sobrevivir a diferentes medios y alternar entre ambientes libres y asociados al hospedador.

Resultados anteriores de este laboratorio, permitieron demostrar que *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial e induce el proceso de autofagia desde el espacio extracelular, probablemente a través o mediado por la acción de una exoproteína. El patógeno ingresa a la célula hospedadora contenido en una vacuola que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales. Una población mayoritaria de las bacterias intracelulares se replica rápidamente y se mantiene estable hasta los 480 min p.i.

En este trabajo de tesis, se ha profundizado en el tráfico intracelular que realiza *S. marcescens* en la célula epitelial y los mecanismos moleculares que utiliza esta bacteria para proliferar en el hospedador. Los ensayos aquí desarrollados demuestran que *S. marcescens* es capaz de invadir y multiplicarse en distintas células epiteliales y fibroblastos, y de disparar el proceso autofágico en estos tipos celulares. Este patógeno dispara un proceso autofágico no canónico que incluye la participación de Atg5 pero no de PI3K. La actividad PI3K y posiblemente Atg5 serían requeridos en el proceso de internalización en la célula hospedadora. Además, se requiere un ambiente con bajo pH para la acción de uno o más factores bacterianos involucrados en el mecanismo de internalización o los procesos tempranos de la invasión de *S. marcescens*. Asimismo, se demostró que *Serratia* evita o retrasa la fusión de las SeCV con los lisosomas, manipulando el tráfico vesicular normal de la célula y evitando su degradación.

Adicionalmente, se demostró que la expresión de ShIA es responsable del fenotipo autofágico inducido por *S. marcescens* desde el espacio extracelular, pero no estaría involucrada en el reclutamiento de LC3 a la SeCV. Además, en una etapa más avanzada de la infección celular ShIA dañaría la membrana de la SeCV y está involucrada en la salida de las bacterias desde la célula eucariota y en la diseminación de *S. marcescens* al medio extracelular. Este mecanismo de salida no involucra un pasaje a través del citoplasma de la célula invadida y no provoca alteraciones en la integridad de dicha célula.

Los resultados expuestos aquí permitieron profundizar en el modelo de infección de *S. marcescens* en células no fagocíticas y concluir que este patógeno oportunista es capaz de modular el proceso de autofagia celular, encontrando en vesículas con características autofagosomales un nicho apropiado donde replicarse. Además, se identificó a la hemolisina ShIA como el factor responsable de la inducción del proceso de autofagia desde el espacio extracelular y como un factor necesario para mediar la salida de la bacteria de la célula hospedadora.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante los ensayos de infección en *D. melanogaster*, mostraron que éste constituye un excelente modelo de análisis en un organismo hospedador íntegro y permite el rápido y eficiente estudio de potenciales factores de virulencia de *Serratia* y su mecanismo de acción.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexeyev, M. F. (1999).** The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *Biotechniques* **26**, 824–6, 828.
- Alix, E., Mukherjee, S. & Roy, C. R. (2011).** Subversion of membrane transport pathways by vacuolar pathogens. *J Cell Biol* **195**, 943–52.
- Alonso, A. & García-del Portillo, F. (2004).** Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**, 181–91.
- Anderson, G. G., Yahr, T. L., Lovewell, R. R. & O'Toole, G. a. (2010a).** The *Pseudomonas aeruginosa* magnesium transporter MgtE inhibits transcription of the type III secretion system. *Infect Immun* **78**, 1239–49.
- Anderson, J. K., Smith, T. G. & Hoover, T. R. (2010b).** Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* **18**, 30–7.
- Angkawidjaja, C. & Kanaya, S. (2006).** Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2804–17.
- Apel, D. & Surette, M. G. (2008).** Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1851–8.
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**, 177–83.
- Barchiesi, J., Castelli, M. E., Di Venanzio, G., Colombo, M. I. & García Vescovi, E. (2012).** The PhoP/PhoQ system and its role in the pathogenesis of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **194**.
- Bier, E. & Guichard, A. (2012).** Deconstructing host-pathogen interactions in *Drosophila*. *Dis Model Mech* **5**, 48–61.
- Birmingham, C. L. & Brumell, J. H. (2006).** Autophagy recognizes intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in damaged vacuoles. *Autophagy* **2**, 156–8.
- Birmingham, C. L., Canadien, V., Guin, E., Troy, E. B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D. E. & Brumell, J. H. (2007).** *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* **3**, 442–51.
- Birmingham, C. L., Higgins, D. E. & Brumell, J. H. (2008).** Avoiding death by autophagy: interactions of *Listeria monocytogenes* with the macrophage autophagy system. *Autophagy* **4**, 368–71.
- Cassidy, S. K. B., Hagar, J. a, Kanneganti, T. D., Franchi, L., Nuñez, G. & O'Riordan, M. X. D. (2012).** Membrane damage during *Listeria monocytogenes* infection triggers a caspase-7 dependent cytoprotective response. *PLoS Pathog* **8**, e1002628.

- Castelli, M. & Vescovi, E. (2011).** The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **193**, 63–74.
- Castelli, M., Fedrigo, G., Clementín, A., Lelmini, M., Feldman, M. F. & Garcia Vescovi, E. (2008).** Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **190**, 213–20.
- Cemma, M. & Brumell, J. H. (2012).** Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. *Curr Biol* **22**, R540–5.
- Chung, Y.-S. A. & Kocks, C. (2011).** Recognition of pathogenic microbes by the *Drosophila* phagocytic pattern recognition receptor Eater. *J Biol Chem* **286**, 26524–32.
- Coulthurst, S. J., Kurz, C. L. & Salmond, G. P. C. (2004).** luxS mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent “quorum sensing” show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology* **150**, 1901–10.
- Coulthurst, S. J., Williamson, N. R., Harris, A. K. P., Spring, D. R. & Salmond, G. P. C. (2006).** Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* **152**, 1899–911.
- Cronin, S. J. F., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, A. J., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes, R. D. M., Gruber, S. & other authors. (2010).** In vivo genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science (80-)* **325**, 340–343.
- Deretic, V., Singh, S., Master, S., Harris, J., Roberts, E., Kyei, G., Davis, A., de Haro, S., Naylor, J. & other authors. (2006).** Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol* **8**, 719–27.
- Dröse, S. & Altendorf, K. (1997).** Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* **200**, 1–8.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. & Givskov, M. (1996a).** Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127–36.
- Eberl, L., Christiansen, G., Molin, S. & Givskov, M. (1996b).** Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the flhD master operon. *J Bacteriol* **178**, 554–9.
- Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-schahn, R. (1999).** Membrane Topology of the Mammalian CMP-Sialic Acid Transporter * **274**, 8779–8787.
- Eiján, A. M., Sandes, E. O., Riveros, M. D., Thompson, S., Pasik, L., Mallagrino, H., Celeste, F. & Casabé, A. R. (2003).** High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* **98**, 262–8.

- Eisenstein, B. I. (1990).** New opportunistic infections--more opportunities. *N Engl J Med* **323**, 1625–7.
- Fedrigo, G. V. (2010).** *Caracterización de factores de virulencia en Serratia marcescens.*
- Fedrigo, G. V, Campoy, E. M., Di Venanzio, G., Colombo, M. I. & García Vescovi, E. (2011).** Serratia marcescens Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles inside Non-Phagocytic Cells. *PLoS One* **6**, 15 (R. C. May, Ed.). Public Library of Science.
- Ferrandon, D. (2013).** The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr Opin Immunol* **25**, 59–70. Elsevier Ltd.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979).** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648–52.
- Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. (2009).** Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**, 355–66.
- Flyg, C., Kenne, K. & Boman, H. G. (1980).** Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* **120**, 173–81.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R. & Nuñez, G. (2012).** Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* **13**, 325–332. Nature Publishing Group.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. a, Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V, Blomgren, K. & other authors. (2009).** Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* **16**, 1093–107.
- Ghigo, E., Colombo, M. I. & Heinzen, R. A. (2012).** The *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole. *Adv Exp Med Biol* **984**, 141–69.
- Givskov, M. & Molin, S. (1992).** Expression of extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens* is growth-phase-dependent, catabolite-repressed and regulated by anaerobiosis. *Mol Microbiol* **6**, 1363–74.
- Givskov, M., Eberl, L., Christiansen, G., Benedik, M. J. & Molin, S. (1995).** Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Mol Microbiol* **15**, 445–54.
- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R. G. & van der Goot, F. G. (2011).** Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol* **13**, 1026–43.
- Grimont, P. A. & Grimont, F. (1978).** The genus *Serratia*. *Annu Rev Microbiol* **32**, 221–48.

- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., Deretic, V. & Carolina, N. (2004).** Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages **119**, 753–766.
- Gutierrez, M. G., Vázquez, C. L., Munafó, D. B., Zoppino, F. C. M., Berón, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. (2005).** Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell Microbiol* **7**, 981–93.
- Gutierrez, M. G., Saka, H. A., Chinen, I., Zoppino, F. C. M., Yoshimori, T., Bocco, J. L. & Colombo, I. (2007).** Protective role of autophagy against Vibrio cholerae cytolysin , a pore-forming toxin from V . cholerae **104**, 1829–1834.
- Hejazi, A. & Falkiner, F. (1997).** Serratia marcescens. *J Med Microbiol* **46**, 903–912.
- Hertle, R., Brutsche, S., Groeger, W., Hobbie, S., Koch, W., Könninger, U. & Braun, V. (1997).** Specific phosphatidylethanolamine dependence of Serratia marcescens cytotoxin activity. *Mol Microbiol* **26**, 853–65.
- Hertle, R., Hilger, M., Weingardt-Kocher, S. & Walev, I. (1999).** Cytotoxic action of Serratia marcescens hemolysin on human epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 817–25.
- Hertle, R. (2000).** Serratia type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 75–89.
- Hertle, R. & Schwarz, H. (2004).** Serratia marcescens internalization and replication in human bladder epithelial cells. *BMC Infect Dis* **4**, 16.
- Hilbi, H. & Haas, A. (2012).** Secretive bacterial pathogens and the secretory pathway. *Traffic* **13**, 1187–97.
- Van Houdt, R., Givskov, M. & Michiels, C. W. (2007).** Quorum sensing in Serratia. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 407–24.
- Von Hoven, G., Kloft, N., Neukirch, C., Ebinger, S., Bobkiewicz, W., Weis, S., Boller, K., Janda, K. D. & Husmann, M. (2012).** Modulation of translation and induction of autophagy by bacterial exoproducts. *Med Microbiol Immunol* **201**, 409–18.
- Huang, J. & Brumell, J. H. (2009).** Autophagy in immunity against intracellular bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 189–215.
- Huang, Y.-H., Ferrières, L. & Clarke, D. J. (2006).** The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* **157**, 206–12.
- Hughson, F. M. & Reinisch, K. M. (2010).** Structure and mechanism in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 454–460. Elsevier Ltd.
- Invitrogen and Molecular Probes. (2007).** LysoTracker and LysoSensor probes.
- Ireton, K. (2013).** Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol* **3**, 130079.

- Jaber, N. & Zong, W.-X. (2013).** Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann N Y Acad Sci* **1280**, 48–51.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clément, E., Menozzi, F. D. & Locht, C. (1996).** Amino-terminal maturation of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **19**, 65–78.
- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S. & Clantin, B. (2013).** Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* **164**, 583–95.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2000).** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720–8.
- Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J.-L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T. & Yoshimori, T. (2011).** The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Mol Biol Cell* **22**, 2290–300.
- Kakuda, T. & DiRita, V. J. (2006).** Cj1496c encodes a Campylobacter jejuni glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract. *Infect Immun* **74**, 4715–23.
- Kayal, S. & Charbit, A. (2006).** Listeriolysin O: a key protein of Listeria monocytogenes with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 514–29.
- Kelekar, A. (2005).** Autophagy. *Ann N Y Acad Sci* **1066**, 259–71.
- Kloft, N. & Neukirch, C. (2010).** Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins. *Med Microbiol ...* **199**, 299–309.
- Knodler, L. a, Vallance, B. a, Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M. & Steele-Mortimer, O. (2010).** Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17733–8.
- Kounatidis, I. & Ligoxygakis, P. (2012).** Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–6.
- Krzywińska, S., Ochocka, K. & Kaznowski, A. (2012).** Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to nonpigmented Serratia marcescens strains. *ScientificWorldJournal* **2012**, 679639.
- Kumar, A. & Worobec, E. A. (2005).** Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of Serratia marcescens. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1495–501.

- Kuraishi, T., Hori, A. & Kurata, S. (2013).** Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol* **4**, 375.
- Kurz, C. L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A. & other authors. (2003).** Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J* **22**, 1451–60.
- Labbate, M., Queck, S. Y., Koh, K. S., Rice, S. A., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2004).** Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**, 692–8.
- Létoffé, S., Ghigo, J. M. & Wandersman, C. (1994).** Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9876–80.
- Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. (2011).** Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323–35.
- Lin, C., Horng, J., Yang, C.-H. & Tsai, Y. (2010).** RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect ...* **78**, 4870–81.
- Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998).** N -Acyl- L -Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384–6388.
- Lopez-Castejon, G., Corbett, D., Goldrick, M., Roberts, I. S. & Brough, D. (2012).** Inhibition of calpain blocks the phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* **7**, e35936.
- Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V & Ratner, A. J. (2013).** Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 173–207.
- Macnab, R. M. (2003).** How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77–100.
- Mahlen, S. D. (2011).** *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**, 755–91.
- Marre, R., Hacker, J. & Braun, V. (1989).** The cell-bound hemolysin of *Serratia marcescens* contributes to uropathogenicity. *Microb Pathog* **7**, 153–6.
- Maseda, H., Hashida, Y., Shirai, A., Omasa, T. & Nakae, T. (2011).** Mutation in the *sdeS* gene promotes expression of the *sdeAB* efflux pump genes and multidrug resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2922–6.
- Mayinger, P. (2012).** Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1104–13. Elsevier B.V.
- Mazar, J. & Cotter, P. a. (2007).** New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**, 508–15.

- McCarter, L. L. (2006).** Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol* **9**, 180–6.
- McMahon, K. J., Castelli, M. E., García Vescovi, E. & Feldman, M. F. (2012).** Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J Bacteriol* **194**, 3241–9.
- Merino, S., Gavín, R., Altarriba, M., Izquierdo, L., Maguire, M. E. & Tomás, J. M. (2001).** The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS Microbiol Lett* **198**, 189–95.
- Mestre, M., Fader, C., Sola, C. & Colombo, M. (2010).** α -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy* **6**, 110–125.
- Meyer-Morse, N., Robbins, J. R., Rae, C. S., Mochegova, S. N., Swanson, M. S., Zhao, Z., Virgin, H. W. & Portnoy, D. (2010).** Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS One* **5**, e8610.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2001).** Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**, 657–68.
- Molecular Probes and Invitrogen. (2001).** DQ™ BSAs: Self-Quenched BODIPY® Dye Conjugates of Bovine Serum Albumin.
- Mostowy, S. & Cossart, P. (2012).** Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? *Trends Cell Biol* **22**, 283–91. Elsevier Ltd.
- Mounier, J., Popoff, M. R., Enninga, J., Frame, M. C., Sansonetti, P. J. & Van Nhieu, G. T. (2009).** The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000271.
- Münz, C. (2009).** Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol* **27**, 423–49.
- Nehme, N. T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J. a., Ewbank, J. J. & Ferrandon, D. (2007).** A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* **3**, e173.
- Nehme, N. T., Quintin, J., Cho, J. H., Lee, J., Lafarge, M.-C., Kocks, C. & Ferrandon, D. (2011).** Relative roles of the cellular and humoral responses in the *Drosophila* host defense against three gram-positive bacterial infections. *PLoS One* **6**, e14743.
- Ondraczek, R., Hobbie, S. & Braun, V. (1992).** In vitro activation of the *Serratia marcescens* hemolysin through modification and complementation. *J Bacteriol* **174**, 5086–94.

- Panayidou, S., Ioannidou, E. & Apidianakis, Y. (2014).** Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: Disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence* **5**.
- Patrick, J. E. & Kearns, D. B. (2012).** Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol Microbiol* **83**, 14–23.
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M.-C. & other authors. (2010).** Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell Microbiol* **12**, 530–44.
- Petersen, L. M. & Tisa, L. S. (2013).** Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol* **59**, 627–40.
- Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Baxter, M. A., Harrington, A. T., Blocker, A. & Picking, W. D. (2005).** IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun* **73**, 1432–40.
- Poole, K., Schiebel, E. & Braun, V. (1988).** Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **170**, 3177–3188.
- Pramanik, A., Könninger, U., Selvam, A. & Braun, V. (2013).** Secretion and activation of the *Serratia marcescens* hemolysin by structurally defined SHB mutants. *Int J Med Microbiol* 1–9. Elsevier GmbH.
- Qa'Dan, M., Spyres, L. M. & Ballard, J. D. (2000).** pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. *Infect Immun* **68**, 2470–4.
- Rabinovich, G. a & Gruppi, a. (2005).** Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* **27**, 103–114.
- Randow, F. & Münz, C. (2012).** Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol* **33**, 475–87.
- Reece, K. S. & Phillips, G. J. (1995).** New plasmids carrying antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **165**, 141–2.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. (2001).** A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**, 1114–25.
- Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Berón, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. (2007).** The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell Microbiol* **9**, 891–909.
- Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. (2012).** Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* **22**, R29–34. Elsevier Ltd.
- Rutschmann, S., Kilinc, A. & Ferrandon, D. (2002).** Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* **168**, 1542–6.

- Sambrook J, Fritsch EF, and M. T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harb New York.
- Schiebel, E., Schwarz, H. & Braun, V. (1989).** Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J Biol Chem*.
- Schonherr, R., Hilger, M., Broer, S., Benz, R. & Braun, V. (1994).** Interaction of *Serratia marcescens* hemolysin (ShlA) with artificial and erythrocyte membranes Demonstration of the formation of aqueous multistate channels **663**, 655–663.
- Schroeder, G. N. & Hilbi, H. (2008).** Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* **21**, 134–56.
- Segev, N. (2011).** Coordination of intracellular transport steps by GTPases. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 33–38.
- Shimuta, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N. & Watanabe, H. (2009).** The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiol* **9**, 261.
- Simon R, Priefer U, and P. A. (1983).** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784 – 791.
- Soo, P.-C., Horng, Y.-T., Chang, Y.-L., Tsai, W.-W., Jeng, W.-Y., Lu, C.-C. & Lai, H.-C. (2013).** ManA is regulated by RssAB signaling and promotes motility in *Serratia marcescens*. *Res Microbiol*. Elsevier Ltd.
- Stock, I., Grueger, T. & Wiedemann, B. (2003).** Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *Int J Antimicrob Agents* **22**, 35–47.
- Tattoli, I., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. (2012).** The bacterial and cellular determinants controlling the recruitment of mTOR to the Salmonella-containing vacuole. *Biol Open* **1**, 1215–25.
- Tattoli, I., Sorbara, M. T., Yang, C., Tooze, S. A., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. (2013).** *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J* **32**, 3066–78.
- Terebiznik, M., Raju, D., Vázquez, C., Torbricki, K., Reshma, K., Blanke, S. R., Yoshimori, T., Colombo, M. I. & Jones, N. L. (2009).** Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy* **5**, 370–379.
- Thurston, T. & Wandel, M. (2012).** Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**, 414–8.
- Tsai, Y.-H., Wei, J.-R., Lin, C.-S., Chen, P.-H., Huang, S., Lin, Y.-C., Wei, C.-F., Lu, C.-C. & Lai, H.-C. (2011).** RssAB signaling coordinates early development of surface multicellularity in *Serratia marcescens*. *PLoS One* **6**, e24154.

- Umata, T., Moriyama, Y., Futai, M. & Mekada, E. (1990).** The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *J Biol Chem* **265**, 21940–5.
- Walker, G., Hertle, R. & Braun, V. (2004).** Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun* **72**, 611–614.
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. (2011).** Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H+-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19371–6.
- Wong, X. M., Younger, S., Peters, C. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (2013).** Subdued, a TMEM16 family Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in *Drosophila melanogaster* with an unexpected role in host defense. *Elife* **2**, e00862.
- Xie, Z. & Klionsky, D. J. (2007).** Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102–9.