

# Mutaciones en *ppGpp* y *dksA* afectan la secreción de proteínas efectoras de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

*Tania Gaviria Cantin*  
*Universidad Santiago de Cali, Colombia*

*Luisa María Nieto Ramírez*  
*Universidad Santiago de Cali, Colombia*

*Carlos Balsalobre Parra*  
*Universidad de Barcelona, España*

## 4.1 Introducción

**E**l género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está compuesto por bacterias Gram negativas, no esporuladas, en forma de bacilo. *Salmonella* tiene importante relevancia a nivel de salud pública ya que es uno de los principales patógenos entéricos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Diferentes serovares pueden causar dos patologías claramente diferenciadas, salmonelosis y fiebres tifoideas. La salmonelosis es una gastroenteritis cuyos síntomas son diarrea, fiebre, vómito y dolor abdo-

minal, causada por toda una serie de serovares no tifoideos, que también pueden infectar un amplio rango de animales. Los serovares más relevantes son Typhimurium y Enteritidis, (Ohl & Miller, 2001; Gordon, 2008). En Colombia, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es el serovar más prevalente. El último reporte del Instituto Nacional de Salud mostró que, de los 23 serovares incidentes en el país, el serovar *Typhimurium* representa el 30% del total de los aislamientos que se realizaron entre los años 1997 y 2016.

Los genes de virulencia de *S. Typhimurium* están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI, del inglés *Salmonella pathogenicity island*). Si bien se ha identificado un elevado número de SPIs, hay cinco que se encuentran ampliamente distribuidas entre los serovares no tifoideos. De éstas, la denominada SPI-1 es una de las más caracterizadas. SPI-1 codifica para proteínas efectoras y para un sistema de secreción de tipo III (T3SS) requerido para secretar proteínas efectoras, codificadas tanto dentro como fuera de la SPI-1. Una vez en el citoplasma de la célula hospedadora, estas proteínas efectoras desencadenan el proceso de invasión de *Salmonella* en células no fagocíticas mediante la reordenación del citoesqueleto de actina (Marcus, Brumell, Pfeifer, & Finlay, 2000) (SPI). Se han identificado al menos trece proteínas cuya secreción es mediada por el T3SS de la SPI-1 (T3SS-1): AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SptP y SspH, cuya función principal es inducir el ondulamiento de la membrana de la célula hospedadora, resultando en la entrada de la bacteria.

La alarmona (p)ppGpp, tetra- o penta-fosfato de guanosina, es un nucleótido modificado que actúa como mensajero secundario en respuesta a diferentes tipos de estrés. En enterobacterias su síntesis está catalizada por RelA y SpoT. RelA es la principal proteína productora de ppGpp en condiciones de carencia de

aminoácidos. SpoT es capaz de sintetizar ppGpp en respuesta a otras condiciones de estrés y es la enzima responsable de su degradación (Cashel, M; Gentry, D; Hernandez, V; y Vinella, 1996). ppGpp es la molécula efectora de lo que se conoce como respuesta estricta, inicialmente descrita como la respuesta por la que se regula el número de ribosomas atendiendo a la cantidad de aminoácidos presentes en el medio. La represión de la producción de ribosomas en situaciones de carencia de aminoácidos tiene un efecto global en la célula causando una reducción de la síntesis proteica y de la tasa de crecimiento (Sands & Roberts, 1952) (Stent & Brenner, 1961).

DksA es una proteína de 151 aminoácidos y un tamaño de 17 kDa, que se encuentra en muchas bacterias incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Salmonella*. Estudios previos han relacionado DksA con multitud de procesos celulares tales como división celular, respuesta estricta, *quorum sensing* o virulencia, tanto en *E. coli* como en otras proteobacterias relacionadas (Paul et al., 2004) ppGpp and the initiating NTP, that bind to RNA polymerase (RNAP. Se ha demostrado que DksA potencia el efecto represor de ppGpp sobre los promotores de los ARNr y su efecto estimulador sobre los promotores de los operones de algunos genes responsables de la síntesis de aminoácidos, sugiriendo que ppGpp y DksA son cofactores (Paul et al., 2004) ppGpp and the initiating NTP, that bind to RNA polymerase (RNAP. Además, se ha determinado que DksA se une al centro catalítico de la ARNpol junto con ppGpp (Perederina et al., 2004). ppGpp y DksA conjuntamente reprimen y/o estimulan directamente la transcripción al causar alteraciones en la formación del complejo abierto de la ARNpol durante el inicio de transcripción. Además se ha propuesto que ppGpp junto con DksA pueden afectar la expresión de otros muchos genes al afectar la afinidad de la ARNpol por la interacción con subunidades sigma alternativas como  $\sigma^s$  y  $\sigma^{54}$  (Gourse, Ross, & Rutherford, 2006) (Magnusson, Farewell, &

Nyström, 2005). También se ha descrito que DksA y ppGpp incrementan la fidelidad de la transcripción al disminuir la tasa de incorporación incorrecta de nucleótidos (Roghianian, Zenkin, & Yuzenkova, 2015).

En este capítulo se presentan los resultados de un estudio donde se analizó el efecto de la alarmona ppGpp y la proteína DksA en la secreción de proteínas efectoras de la isla de patogenicidad 1.

## 4.2 Materiales y métodos

Para analizar el efecto de la proteína DksA y la alarmona ppGpp sobre la secreción de proteínas efectoras en *Salmonella*, fue necesario crear mutantes para ambos factores. Para ello se llevó a cabo la técnica de inactivación de genes cromosómicos por reemplazamiento alélico (Datsenko & Wanner, 2000). Se obtuvo una cepa en la que se eliminaron los genes *relA* y *spoT* obteniéndose una cepa incapaz de sintetizar ppGpp, denominada mutante ppGpp<sup>0</sup>. Por otro lado, también se obtuvo una cepa mutante *dksA*. Como control en todos los experimentos, se utilizó la cepa salvaje (*wild type*: WT) SV5015 (SL1344 *his*<sup>+</sup>). En la Tabla 8 se encuentran todas las cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla 8. Lista de cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
SV5015	<i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium SL1344 <i>his</i> <sup>+</sup>	(Vivero et al., 2008)
SV5015 ppGpp <sup>0</sup>	Mutación genes <i>relA</i> y <i>spoT</i>	Este estudio
SV5015 <i>dksA</i>	Mutación gen <i>dksA</i>	Este estudio
SV5015 ppGpp <sup>0</sup> SipA::3flag	Transducción SipA::3flag	Este estudio
SV5015 <i>dksA</i> SipA::3flag		

Fuente: Elaboración propia, 2016.

## 4.3 Técnicas experimentales con proteínas

### 4.3.1 Precipitación de proteína total secretada

Las proteínas secretadas por las diferentes cepas de *Salmonella* fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para ello se utilizaron cultivos bacterianos en LB a una densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de 2,0. Se obtuvieron sobrenadantes libres de células por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos y la remoción final de células y fragmentos celulares usando filtros de 0,22  $\mu$ m (Millex-GP; poliétersulfona, 50 mm). Las proteínas presentes se precipitaron por incubación con ácido tricloroacético (TCA) frío a una concentración final del 10% durante 1 hora en hielo. A continuación, se centrifugó la muestra 20 min a 13 000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se añadió acetona al 80% fría. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante. El sedimento con las proteínas precipitadas se resuspendió en tampón de carga para proteínas (5 % glicerol, 2,5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 1,15% SDS, 31,25mM Tris, 0,05% azul de bromofenol). La presencia de restos de ácido tricloroacético provocó una acidificación del medio que se evidenció por el viraje de color del tampón de proteínas de azul a amarillo. Se añadió Tris-Base saturado para neutralizar el pH, retornando el color azul a la muestra. Las muestras se incubaron durante 5 min a 100°C. Se guardaron a -20°C hasta su análisis.

### 4.3.2 Obtención de extractos celulares

Este método se utilizó para detectar proteínas intracelulares. Para ello, se recogieron las células de 1 ml de cultivo por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en tampón de carga para proteínas. El volumen utilizado en cada caso fue el valor de la  $DO_{600nm}$  dividido entre 4 en ml. De esta manera se consiguió normalizar la concentración de proteína atendiendo a la biomasa de los cultivos. Una vez resuspendido el sedimento celular en el tampón de proteínas, se incubó durante 5 min a 100°C para lisar las células.

### 4.3.3 Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron transferidas a un soporte sólido para ser posteriormente detectadas mediante anticuerpos específicos.

Las proteínas separadas por electroforesis fueron electrotransferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) utilizando el EBU 4000: Semy-Dry Blotting System CE (C. B. S. Scientific). El gel de poliacrilamida se depositó encima de la membrana, y el conjunto se situó entre ocho piezas de papel de transferencia (Whatman 3 mm). Se aplicó un amperaje de 60 mA (4-10 voltios) durante 1 hora.

Tras la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó mediante incubación durante una hora a temperatura ambiente en PBS-T (80 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $NaH_2PO_4$ , 100 mM NaCl pH 7,3, 0,2 % Tritón™ X-100) conteniendo leche descremada en polvo al 5 % como agente de bloqueo. A continuación, se descartó la solución de bloqueo y se incubó la membrana a la

misma temperatura durante 1 hora con el anticuerpo contra la proteína que se quería detectar (anti-Flag: 1:10000 (Sigma)), diluido en 10 ml de tampón PBS-T con leche descremada al 2,5%. El exceso de anticuerpo fue eliminado con tres lavados de 10 min cada uno en PBS-T. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que permitía la detección del anticuerpo primario, diluido en PBS-T. El exceso de anticuerpo secundario también fue eliminado con tres lavados de 10 min cada uno en PBS-T.

Para iniciar el revelado mediante detección de quimioluminiscencia se utilizó el kit ECLTM Western Blotting, GE Healthcare o LUMI-LIGHT (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La detección y cuantificación se llevó a cabo con el equipo Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Bio Rad y el software Quantity One 4.6.6.

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Perfil de proteínas secretadas en las cepas mutantes ppGpp<sup>0</sup> y *dksA*

Se caracterizaron los perfiles de las proteínas secretadas (secretoma) en cultivos de la cepa WT (de ahora en adelante denominada “wild type” (WT)) y en los mutantes ppGpp<sup>0</sup> y *dksA*, en LB en fase estacionaria (DO<sub>600nm</sub> de 2,0) a 37 °C en agitación. Estas son condiciones descritas para la inducción de la expresión de la SPI-1 (Bustamante et al., 2008). Los extractos de proteínas secretadas fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior tinción con azul de Coomassie. En la Figura 4 se muestran los resultados.

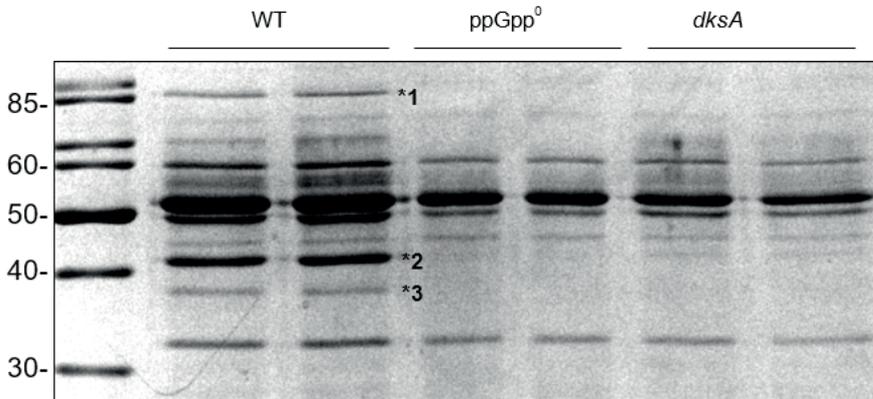


Figura 4. Perfil de proteínas secretadas (secretoma) de las cepas WT (SV5015) y mutantes *ppGpp*<sup>0</sup> y *dksA*. Las cepas fueron crecidas en LB a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 2,0 tras ser inoculadas a una  $DO_{600nm}$  de 0,001. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a partir de cultivos independientes fueron filtrados para eliminar células residuales y las proteínas presentes se precipitaron con TCA a una concentración final del 10 %. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Las bandas proteicas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a una mezcla de proteínas con las masas indicadas en kDa. Se indican las bandas que presumiblemente corresponden a las proteínas: 1. *SipA*, 2. *SipC* y 3. *SipD*.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Como se puede observar, al comparar el perfil proteico de la cepa WT con las mutantes *ppGpp*<sup>0</sup> y *dksA*, se observan varias diferencias reveladas por la intensidad de las bandas observadas. Atendiendo a su peso molecular estimado y a trabajos previos publicados, algunas de las bandas de la WT correspon-

den a las proteínas: 1. SipA 2. SipC y 3. SipD, descritas como proteínas efectoras secretadas por el T3SS y codificadas en la SPI-1 (Komoriya et al., 1999) (Mizusaki, Takaya, Yamamoto, & Aizawa, 2008). En la cepa mutante ppGpp<sup>0</sup> se observa ausencia total de estas tres proteínas, lo que no ocurre en la cepa mutante *dksA* donde están ausentes las proteínas SipA y SipD, pero SipC se encuentra con una intensidad disminuida mas no ausente. Estos resultados sugieren que ppGpp y DksA estarían jugando un papel importante en la secreción de las proteínas efectoras de la SPI-1.

Estudios de inmunodetección de la proteína SipA fueron realizados para confirmar los resultados del secretoma de las diferentes cepas de *Salmonella*. Se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína SipA, utilizando una cepa derivada de SV5015, en la que la proteína SipA se expresa conteniendo una etiqueta 3Flag en el extremo carboxi-terminal (Hüttener, Dietrich, Paytubi, & Juárez, 2014) (Uzzau, Figueroa-Bossi, Rubino, & Bossi, 2001). La construcción génica que permite expresar SipA::3Flag fue transducida a las cepas ppGpp<sup>0</sup> y *dksA*. Extractos de proteínas intracelulares de las diferentes cepas fueron obtenidos a partir de cultivos independientes crecidos en LB a 37 °C y en agitación hasta una DO<sub>600nm</sub> de 2,0. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-Flag. Se puede observar que la cantidad de proteína SipA está importantemente reducida en las cepas mutantes ppGpp<sup>0</sup> y *dksA* respecto a la cepa WT (Figura 5). Estos resultados confirman lo anteriormente mostrado en el secretoma, donde la cantidad de proteína SipA secretada al medio extracelular es prácticamente ausente en las cepas mutantes.

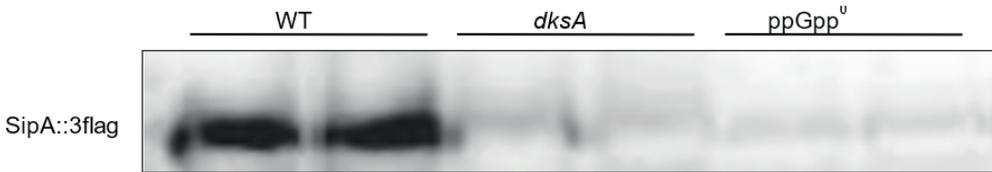


Figura 5. Inmunodetección de la proteína efectora SipA en extractos de proteínas intracelulares obtenidos a partir de dos cultivos independientes de las cepas WT (*sipA::3Flag*) y sus mutantes *dksA* y *ppGpp<sup>u</sup>* crecidas en LB a 37 °C en agitación a una DO600nm de 2,0 tras ser inoculadas a una DO600nm de 0,001. La detección de la etiqueta 3Flag se realizó mediante el anticuerpo monoclonal anti-Flag. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL.

Fuente: Elaboración propia, 2016

## 4.5 Discusión

Se ha descrito que en *E. coli*, la proteína DksA actúa como un cofactor que se une directamente al canal secundario de la ARN polimerasa, potenciando el efecto de ppGpp durante la respuesta estricta. Además, se ha demostrado que ppGpp juega un papel importante en relación a la virulencia en varias bacterias incluyendo *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Aberg et al., 2006) (Klinkenberg et al., 2010) (Hammer, Tateda, & Swanson, 2002) (Zusman, Gal-Mor, & Segal, 2002) (Haralalka, Nandi, & Bhadra, 2003) (Erickson, Lines, Pesci, Venturi, & Storey, 2004).

En *Salmonella spp*, las proteínas efectoras presentes en la SPI-1, son importantes para llevar a cabo el proceso de invasión de células epiteliales. Se ha descrito que dentro de las proteínas

que llevan a cabo una alteración de la membrana plasmática de la célula hospedadora permitiendo la entrada de la bacteria, se encuentran las proteínas Sip. En este capítulo, se observó primero que la ausencia de DksA y ppGpp, impide que *Salmonella* lleve a cabo la secreción de las proteínas SipA, SipC y SipD en fase de crecimiento estacionaria. Teniendo en cuenta que los niveles de ppGpp incrementan drásticamente en el inicio de fase estacionaria, los resultados sugieren que ppGpp podría estar implicado en la regulación fisiológica de la producción de estas proteínas. También observamos que hubo una disminución importante en la proteína SipA intracelular en ausencia de DksA y ppGpp, sugiriendo por tanto que ppGpp podría estar afectando la expresión de los genes que codifican para las proteínas Sip. Estos resultados, concuerdan con lo previamente descrito por Pizzaro y Cerdá, indicando que ppGpp juega un importante papel como regulador de la expresión de los genes de virulencia en *S. Typhimurium*. Ellos observaron que cepas de *Salmonella* mutantes *relA spoT*, mostraron ser no invasivas en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Estas cepas presentaban una reducción importante en la expresión de los genes *hilA* e *invF* que codifican para los principales activadores transcripcionales de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Ninguna de las condiciones de crecimiento probadas que simulaban las condiciones intestinales, fueron capaces de inducir la expresión de *hilA* en ausencia de ppGpp (Pizarro-Cerdá & Tedin, 2004). Más adelante, Thompson y colaboradores describieron que ppGpp estaría involucrado en la transducción de señales ambientales que regulan los genes de virulencia. Thompson y sus colaboradores observaron que ppGpp era necesario para la expresión de *hilA*, *hilC*, *hilD* e *invF*, y, por tanto, para la expresión de los genes de la SPI-1, en condiciones limitantes de oxígeno (Thompson et al., 2006). Por otro lado, Azriel y colaboradores demostraron que DksA regula positivamente los genes de la SPI-1 mediante ensayos de invasión de células epiteliales, en mitad de la fase exponencial de crecimiento (Azriel, Goren, Rahav, &

Gal-Mor, 2016), apoyando nuestros hallazgos. Curiosamente, nuestros resultados fueron contrarios a los reportados por Rice y colaboradores, donde ellos observan mediante ensayos transcripcionales que cepas carentes de DksA aumentan los niveles de expresión de genes de la SPI-1 en fase estacionaria (Rice, Ramachandran, Shearer, & Thompson, 2015). Cabe mencionar, que nuestros resultados fueron confirmados con estudios transcripcionales de microarrays, donde se observa que en ausencia de *dksA*, los genes *sipA*, *sipC* y *sipD* disminuyen su expresión con valores de fold change de -8,69, -3,67, -10,28, respectivamente, en comparación con la cepa WT (datos completos no mostrados).

## **4.6 Conclusiones**

Las proteínas efectoras SipA, SipC y SipD, no son secretadas en las cepas mutantes para la proteína DksA y la alarmona ppGpp.

La proteína SipA disminuye su expresión en ausencia de DksA y ppGpp.

## **Agradecimientos**

A la Universidad de Barcelona, por ser la entidad en donde se financió y ejecutó este estudio. A todo el grupo de investigación de factores de virulencia bacteriana (Laboratorio 4) del departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona y al grupo de investigación de la Doctora Ute Römling del Instituto Karolinska de Estocolmo, Suecia por el acompañamiento y colaboración durante la ejecución de los experimentos.



## Referencias

- Cashel, M.; Gentry, D.; Hernandez, V.; Vinella, D. (1996). The stringent response in *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. *ASM Press Washington DC*, 1, 1458–1489.
- F., Juárez, A., & Madrid, C. (2008). Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1152–6. <https://doi.org/10.1128/JB.01206-07>
- Gordon, M. (2008). *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *The Journal of Infection*, 56(6), 413–422.
- Gourse, R. L., Ross, W., & Rutherford, S. T. (2006). General pathway for turning on promoters transcribed by RNA polymerases containing alternative sigma factors. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4589–91. <https://doi.org/10.1128/JB.00499-06>
- Magnusson, L. U., Farewell, A., & Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 13(5), 236–42. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.008>
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(2), 145–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742687>
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that

- potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., & Vassilyev, D. G. (2004). Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, 118(3), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.030>
- Roghanian, M., Zenkin, N., & Yuzenkova, Y. (2015). Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1529–36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv003>
- SANDS, M. K., & ROBERTS, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 63(4), 505–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=169301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- STENT, G. S., & BRENNER, S. (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 2005–14. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=223254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vivero, A., Baños, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., García-del Portillo,