

2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Relación entre la tasa de mutagénesis y la virulencia en *S. typhimurium* (Anexo I)

La capacidad adaptativa de las bacterias patógenas a un entorno cambiante como el que ofrece el huésped, es un punto crucial durante el proceso infeccioso. Uno de los mecanismos que permiten dicha adaptación es la variabilidad génica. Se ha observado, por ejemplo, que ésta es esencial para el completo desarrollo de infecciones de *Neisseria spp.* o *Haemophilus influenzae* (Serkin et al (2000), Gilsdorf (1998)), donde el elevado polimorfismo de determinados genes facilita la evasión de los sistemas de defensa del huésped.

Esta capacidad de variación puede ser espontánea, debida a la tasa de mutación intrínseca de cada microorganismo, o inducida.

Respecto a la tasa espontánea, se ha descrito la presencia en aislados clínicos de cepas de *E. coli* o de *S. enterica* con una tasa de mutación incrementada (LeClerc et al (1996)) que se conocen como cepas mutadoras. Este incremento en la frecuencia de mutagénesis es debido a la presencia de mutaciones en genes implicados en la topología del DNA (*recG* o *uvrD*) (Horst et al (1999)), en la metilación (*dam* o *ada*), en la replicación, (*dnaQ* o *polC*, que codifican dos subunidades de la DNA polimerasa III), o en procesos de reparación de apareamientos incorrectos (*mutS* o *mutL*). (Tsui et al (1997), Eisen (1998)). El número de aislados portadores de mutaciones en estos sistemas es mayor del que se podría esperar debido a la tasa de mutación espontánea de dichas especies. Por lo que se ha hipotetizado que estas cepas mutadoras presentan una cierta ventaja selectiva respecto a las cepas de las que derivan (Horst et al (1999), Sokuerenko, et al. (1999), LeClerc et al (1996)).

Por otro lado, y relacionado con la tasa inducida de mutación se ha descrito, por ejemplo, la presencia en plásmidos de virulencia de genes *umuDC* (Ruyen-Janecky et al (1999)). Estos genes pertenecen al sistema SOS y participan en el sistema de reparación

tendente al error que permite sobrepasar ciertas lesiones producidas, por ejemplo, por el efecto de los radicales libres existentes en los fagosomas (Buchmeier et al. (1995)). Así, la activación de este sistema puede dar lugar a la introducción de mutaciones que aumentan la variabilidad de la cepa que lo contiene.

En este contexto, y dada la importancia y la actualidad del tema nos planteamos las siguientes cuestiones:

- i) Confirmar, cuantitativa y cualitativamente, la existencia de una ventaja selectiva de las cepas con elevada tasa de mutagénesis.
- ii) Determinar el papel que desempeña la mutación debida a los sistemas dependientes de lesiones en el DNA.
- iii) Valorar el grado de inducción del sistema SOS durante el proceso infectivo.

Para ello se utilizó como modelo la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 y su capacidad de infección de ratones, concretamente de las líneas BALB/c o Swiss, según el caso.

2.1.1. Análisis de la ventaja selectiva de mutantes de *S. typhimurium* con una tasa espontánea de mutagénesis incrementada durante la infección en ratón

2.1.1.1. Construcción de un mutante con una tasa de mutagénesis espontánea incrementada

El gen que se escogió para incrementar la tasa de mutagénesis espontánea de *S. typhimurium* ATCC14028 fue el *mutS*. Este gen codifica una proteína encargada del reconocimiento de los apareamientos incorrectos. Su deficiencia hace que dichos apareamientos erróneos no sean detectados, de forma que los sistemas de reparación no pueden corregirlos, dando lugar a un incremento de la tasa de mutación (Buchmeier et al. (1995)).

Para la construcción del mutante *mutS*, se clonó, dicho gen mediante el uso de 2 oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de este gen de *S. typhimurium* existente en el banco de datos (STM2909). Posteriormente se insertó en la diana única *SacII*, situada

en la región interna de dicho gen, una cassette de resistencia a gentamicina (Ω Gm) de 3.2 kb. La construcción *mutS::* Ω Gm se insertó en el vector suicida pGP704 que se introdujo por conjugación en una cepa rifampicina resistente de *S. typhimurium* ATCC14028. De los conjugantes obtenidos se seleccionaron aquellos que habían incorporado la construcción *mutS::* Ω Gm y que además habían perdido el vector suicida. Estos clones, fruto de un doble intercambio, presentaban, como era de esperar, una tasa de mutagénesis espontánea, valorada por la frecuencia de resistentes a 50 μ g/ml de ácido nalidíxico, casi 1000 veces mayor que la de la cepa receptora. Todos los clones se comportaron de forma homogénea, así que se seleccionó uno de ellos, UA1770, para proseguir el estudio con él.

2.1.1.2. Virulencia del mutante *mutS*

Se ha descrito que mutantes resistentes a rifampicina de *S. typhimurium* pueden ser avirulentos en ratón (Björkman et al (1998)). Por ello, y para evitar cualquier posible interferencia con la resistencia a rifampicina en la determinación de la capacidad infectiva, se transfirió la construcción *mutS::* Ω Gm desde la cepa rifampicina resistente a la salvaje de *S. typhimurium* ATCC14028 mediante transducción con P22. De los transductantes obtenidos se seleccionaron aquellos que habían incorporado la construcción y que no eran lisógenos. La ausencia de fagos se comprobó mediante la siembra en placas verdes (Davis et al (1980)). Estos nuevos derivados también presentaban una tasa de mutagénesis 1000 veces superior a la de la cepa salvaje e igual a la que habíamos obtenido para los clones isogénicos pero rifampicina resistentes. Como en el caso anterior el comportamiento de los transductantes seleccionados fue homogéneo y se seleccionó uno de ellos, que se designó como UA1773.

El clon seleccionado fue inoculado intraperitonealmente en dos líneas de ratón distintas: BALB/c y Swiss. La primera es una línea mucho más sensible a las infecciones por *S. typhimurium* (Kehres et al (2000)). Independientemente de la línea utilizada se pudo observar que no existían diferencias significativas entre las dosis letales 50% (LD_{50}) calculadas para la cepa salvaje y la cepa *mutS* defectiva (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. LD₅₀ calculadas para la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 y *S. typhimurium* ATCC14028 *mutS*::ΩGm tras la inoculación intraperitoneal en ratones BALB/c y Swiss.

Línea de ratón	Cepa de <i>S. typhimurium</i>	
	ATCC14028	ATCC14028 MutS ⁻
BALB/c	9	21
Swiss	2x10 ³	3.5x10 ³

2.1.1.3. Comparación de la virulencia de la cepa salvaje y la mutante *mutS* en infecciones conjuntas

Después de haber comprobado que el mutante *mutS* no presentaba una virulencia superior a la cepa salvaje, decidimos estudiar si éste presentaba alguna ventaja selectiva respecto a la cepa original. Para ello se realizó una inoculación conjunta de la cepa salvaje y del mutante en el mismo huésped. En el momento de la inoculación, cada una de las dos poblaciones bacterianas representaba el 50% del inóculo. Para este experimento se inocularon únicamente ratones BALB/c con una dosis suficiente para provocar su muerte. Justo antes de que ésta se produjera, se procedió a la extracción de sangre de los animales, valorando en esta muestra la concentración de bacterias a la vez que el porcentaje de células existentes de cada población. Era de esperar que si una de las dos poblaciones inoculadas (salvaje y *mutS*) presentaba una ventaja selectiva frente a la otra, se recuperaría al final del proceso infeccioso en mayor proporción.

Tabla 2.2. Ensayo de competencia entre la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje y el mutante *mutS*.

Composición del inóculo inicial		Porcentaje en sangre de cada cepa al final del proceso infeccioso	
ATCC14028	ATCC14028 MutS ⁻	ATCC14028	ATCC14028 MutS ⁻
50%	50%	54%	46%

Los datos que se muestran son la media de 3 experimentos independientes en los que la variación fue como máximo ± 10%.

El resultado obtenido en el experimento de competencia demuestra que no existe ninguna diferencia significativa entre las dos cepas (Tabla 2.2). Ya que al final del proceso se recupera prácticamente la proporción inicial del inóculo.

2.1.2. Valoración de la ventaja selectiva aportada por los genes *umuDC*

2.1.2.1. Construcción de una cepa de *S. typhimurium* portadora de un plásmido multicopia que contiene los genes *umuDC*

Como hemos comentado anteriormente, los genes *umuDC* forman parte del sistema de reparación SOS o sistema de reparación tendente al error, que permite rellenar al azar los huecos generados por lesiones en el DNA, sin tener en cuenta la complementariedad entre las dos cadenas (Eisen (1998)). La existencia de genes de la familia *umuDC* en plásmidos de virulencia sugiere que quizá este sistema aporta alguna ventaja a las cepas bacterianas patógenas que los contienen (Ruyen-Janecky et al (1999)).

Sin embargo, en *S. typhimurium*, y debido a la existencia de una serie de sustituciones en los residuos 26 y 59 de la proteína UmuC, este sistema da lugar a una tasa de mutación inducida por lesiones en el DNA muy baja (Koch et al (1992)). Para aumentar la frecuencia de mutagénesis inducida de la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 se introdujo, por electroporación, el plásmido pRW30, un derivado del pBR322 que contiene los genes *umuDC* de *E. coli*, completamente funcionales en el entorno de *S. typhimurium*. Se comprobó que la tasa de mutagénesis espontánea de esta cepa era la misma que la de la cepa salvaje, y que, sin embargo, se observaba un incremento de aproximadamente 10 veces de la tasa de mutagénesis inducida.

También, y para intentar aumentar aún más esta frecuencia de mutagénesis, se introdujo mediante electrotransformación el plásmido pRW30 en el mutante *mutS*. Sin embargo, en este caso la irradiación con luz ultravioleta no incrementó la tasa de mutagénesis de la cepa MutS⁻ a pesar de la presencia de los genes *umuDC* de *E. coli*. Aunque no se conocen las causas, este resultado también ha sido reportado en los mutantes *mutS* de *E. coli* (Liu et al (2000)).

2.1.2.2. Virulencia de la cepa de *S. typhimurium* portadora del plásmido pRW30

Las cepas *S. typhimurium* ATCC14028/ pRW30 y *S. typhimurium* ATCC14028 *mutS*:: Ω Gm/ pRW30 se inocularon en ratones BALB/c y Swiss. En ambos casos, las LD₅₀ calculadas para ambas cepas no difieren de las obtenidas para la cepa salvaje o la *mutS* defectiva (Tabla 2.3). Confirmando que las cepas con una mayor tasa de mutagénesis que se han construido no presentan una virulencia mayor que la que se observa para la cepa salvaje.

Tabla 2.3. LD₅₀ calculada para las cepas derivadas de *S. typhimurium* ATCC14028 o *S. typhimurium* ATCC14028 MutS⁻ portadoras del plásmido pRW30 tras la inoculación intraperitoneal en ratones BALB/c y Swiss.

Línea de ratón	Cepa de <i>S. typhimurium</i>		
	ATCC14028	ATCC14028/pRW30	ATCC14028 MutS ⁻ /pRW30
BALB/c	9	13	16
Swiss	2x10 ³	2.1x10 ³	3.3x10 ³

2.1.2.3. Comparación de la capacidad infectiva de la cepa salvaje con las portadoras de los genes *umuDC* de *E. coli* mediante inoculaciones conjuntas

Para determinar si las cepas que tienen una mayor tasa de mutagénesis inducida presentan alguna ventaja durante el proceso infeccioso, se realizaron inoculaciones conjuntas con la cepa salvaje y las portadoras del plásmido pRW30.

Igual que pasaba con la cepa *mutS* defectiva, no se aprecian diferencias significativas entre la cepa salvaje y las que presentan una mutagénesis inducida incrementada (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Experimento de competencia entre distintas cepas portadoras del plásmido pRW30 y la cepa salvaje.

Composición del inóculo inicial (1:1)	Porcentaje en sangre de cada cepa al final del proceso infectivo		
	ATCC14028	ATCC14028 pRW30	ATCC14028 MutS ⁻ /pRW30
ATCC14028+ATCC14028 pRW30	53%	47%	-
ATCC14028+ATCC14028 MutS ⁻ /pRW30	55%	-	45%

Los datos que se muestran son la media de cómo mínimo 3 experimentos independientes en los que la variación fue como máximo de $\pm 10\%$.

2.1.3. Análisis de la mutagénesis a lo largo del proceso infectivo

Paralelamente a la determinación de la virulencia de las cepas construidas para este estudio, también se estimó cual era su tasa de mutagénesis *in vivo*. Para ello, se tomaron muestras de sangre de animales inoculados con cada una de las cepas por separado. Estas muestras se sembraron en placas con ácido nalidíxico y se cuantificó el número de resistentes espontáneos en función de la concentración total de bacterias en sangre.

Tabla 2.5. Frecuencia de aparición de clones resistentes a de ácido nalidíxico. Los resultados corresponden a la media de como mínimo tres experimentos independientes con una variabilidad no superior a $\pm 10\%$

Cepa estudiada	Frecuencia de mutagénesis espontánea <i>in vitro</i> ^a	Frecuencia máxima de mutagénesis inducida por u.v. <i>in vitro</i> ^b	Frecuencia de mutagénesis <i>in vivo</i> ^c
ATCC14028	1.23×10^{-9}	2.28×10^{-7}	1.4×10^{-9}
ATCC14028 MutS ⁻	1.68×10^{-6}	4.78×10^{-6}	5.3×10^{-6}
ATCC14028/pRW30	1.38×10^{-9}	2.44×10^{-6}	1.2×10^{-9}
ATCC14028MutS/pRW30	1.17×10^{-6}	3.29×10^{-6}	3×10^{-6}

^a Frecuencia de aparición de clones Nal^R en un cultivo de noche

^b Frecuencia de aparición de clones Nal^R después de inducir el sistema SOS con luz ultravioleta (u.v.)

^c Frecuencia de aparición de clones Nal^R tras sembrar la sangre obtenida de ratones infectados por cada una de las cepas de *S. typhimurium* indicadas.

Los datos que se muestran en la Tabla 2.5 permiten discutir dos cuestiones: Por un lado, la tasa de mutagénesis espontánea calculada *in vitro* coincide con la que se obtiene *in vivo*, siendo de 10^{-9} para la cepa salvaje y de 10^{-6} para el mutante *mutS*. Por otra parte, el hecho que en las inoculaciones de cepas con pRW30 no se obtenga un número mayor de clones resistentes a nalidíxico, sugiere que a pesar que se ha reportado que los patógenos intracelulares como *S. typhimurium* se ven expuestos durante el proceso infectivo a posibles mutágenos (como el hierro, peróxido de hidrógeno o agentes alquilantes) (Mizrahi et al (1998)) que deberían inducir la respuesta SOS, esta activación no es suficiente para disparar dicho sistema, ya que, en ese caso, se produciría un incremento de la población resistente a nalidíxico aislada de los ratones inoculados con las cepas portadoras del plásmido pRW30.

2.2. Caracterización de un mutante *fur* de *S. typhimurium* (Anexo II)

Como se ha comentado en la introducción, el producto del gen *fur* se encarga de la regulación, positiva o negativa, según el caso, de un gran número de genes vinculados no sólo con hierro (como los sistemas de captación, transporte y almacenamiento de este elemento) sino también con otros regulones encargados, por ejemplo, de la respuesta al estrés oxidativo (Touati et al (2000)), la respuesta de adaptación al pH ácido (Hall et al (1996), Foster et al (1994)) o relacionados con el metabolismo celular global (Panina et al (2001)).

Con el fin de proceder a una caracterización más profunda de la importancia del regulón Fur en bacterias patógenas, y concretamente en *S. typhimurium*, se construyó un mutante Fur⁻ de este organismo que permitió:

- i) Estudiar la implicación de este sistema en la virulencia
- ii) Observar la vinculación de éste con el metabolismo celular a través del control de la entrada de hierro

2.2.1. Obtención de un mutante *fur*

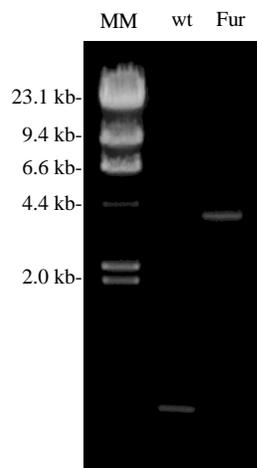
2.2.1.1. Aislamiento del gen *fur*

Para aislar el gen *fur* de *S. typhimurium* ATCC14028 se introdujo una genoteca plasmídica de dicha cepa en la estirpe H1780 de *E. coli*. Esta cepa, además de ser portadora de una mutación en el gen *fur* presenta (tal y como se ha comentado en el apartado 1.1.3.1.3. (iii) de la introducción de la presente memoria) insertada en su cromosoma una fusión entre el gen *fiu*, regulado por Fur, y el gen *lacZ* (Hantke K. (1987)). Este sistema permitió seleccionar, en placas suplementadas con X-Gal, clones en los que la fusión se encontraba reprimida. Después de comprobar que la represión se debía a la presencia de uno de los plásmidos que conformaban la genoteca, se determinó mediante secuenciación que el fragmento que éste contenía codificaba el gen *fur* de *S. typhimurium* ATCC14028. (AF268282).

2.2.1.2. Construcción del mutante *fur*

Para obtener el mutante *fur* se insertó una cassette de resistencia a cloranfenicol (Ω Cm) en la diana interna de restricción *Asp700*. Posteriormente, la construcción *fur::\Omega*Cm se colocó en el vector suicida pGP704, que introducido por conjugación en la cepa rifampicina resistente derivada de la cepa ATCC14028 de *S. typhimurium*, permitió aislar clones que hubieran perdido, como resultado de un doble intercambio, la copia salvaje del gen.

Fig. 2.1. PCR de comprobación de la inserción de la construcción *fur::Cm*. Se muestra el resultado de la PCR con oligonucleótidos internos del gen *fur*, siendo la banda obtenida para la cepa mutante (Fur) 3.5 kb mayor que la salvaje (wt). MM representa el patrón de peso molecular que en este caso fue el DNA del fago λ cortado con la endonucleasa *HindIII* (λ *HindIII*)



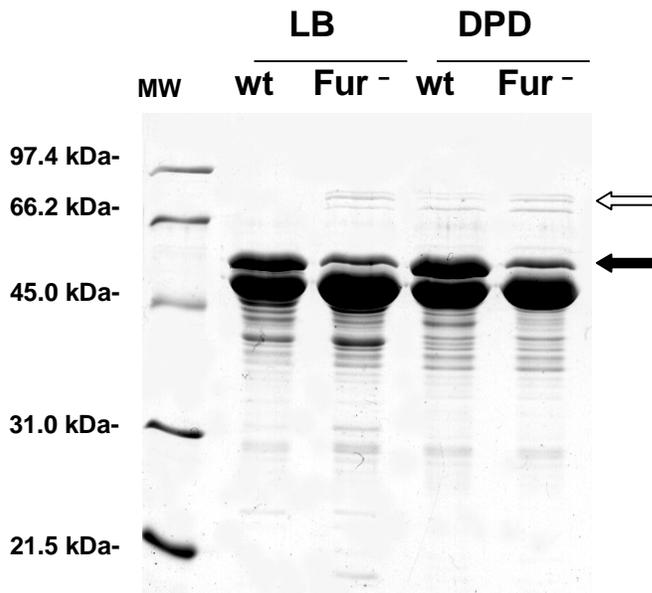


Fig. 2.3. Patrón de proteínas de membrana externa de las cepas salvaje(wt) y mutante (Fur⁻) creciendo en LB o en LB+DPD. La flecha blanca señala las proteínas de alto peso molecular relacionadas con el transporte de hierro. Con la flecha negra se indica la proteína de aprox. 52 kDa cuya presencia disminuye en el mutante *fur*.

En la Fig. 2.3 puede observarse claramente que en la membrana externa del mutante Fur⁻ aparecen una serie de proteínas que sólo se encuentran en la cepa salvaje cuando ésta crece en presencia de DPD. Éstas corresponden a proteínas de alto peso molecular implicados en los diferentes sistemas de captación de hierro (Litwin et al (1996)). Pero además, la Fig. 2.3 deja patente la reducción de una banda de unos 52 kDa. La secuenciación parcial del extremo N-terminal de dicha proteína (que dio como resultado la secuencia aminoacídica: AQVINTNXLXLXTQN) reveló que se trataba de la flagelina, el monómero base del flagelo de *S. typhimurium*.

Por otra parte, la comparación entre el patrón de proteínas de membrana externa de la cepa *fur* deficiente y de la cepa salvaje crecida en presencia de DPD, permite afirmar que la disminución en la cantidad de flagelina existente es independiente de la concentración de hierro en el medio extracelular.

2.2.2. Expresión del regulón flagelar de *S. typhimurium* en el mutante *fur*

La síntesis de flagelos en *S. typhimurium* implica a más de 50 genes que están distribuidos en 17 operones distintos (Chilcott et al (2000)) cuya expresión está sujeta a una cascada jerárquica que conforma lo que se conoce como el regulón flagelar (Fig. 2.4).

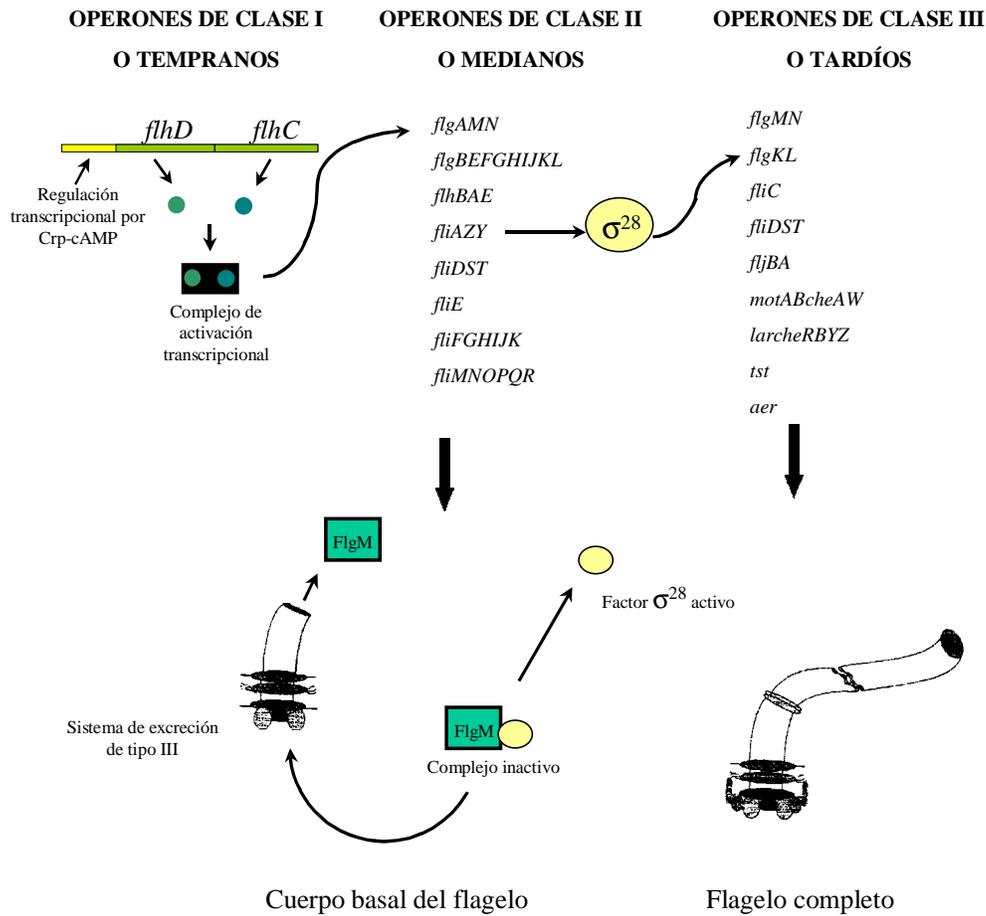


Fig. 2. 4. Esquema básico de los diferentes genes implicados en la síntesis de flagelos en *S. typhimurium*. Se muestra la cascada de activación de los diferentes operones que se agrupan en tres categorías distintas. El producto de los genes *flhD* y *flhC* interviene en la activación de los operones pertenecientes a la Clase II, encargados básicamente de la producción y ensamblaje del cuerpo basal del flagelo. Una vez esta estructura es funcional, permite la liberación de un factor σ^{28} , codificado por el gen *fliA*, que posibilita la transcripción del resto de componentes que culminarán el proceso de síntesis del flagelo.

El operón que se encuentra primero en la jerarquía (*flhDC*) es el encargado de activar la síntesis de todo el resto. Por eso se conoce como *master operon* o promotor de Clase I (Prüß et al (2001), Kutsukake (1997)). Las proteínas FlhD y FlhC son activadores transcripcionales de los promotores de Clase II (Kutsukake et al 1990). Entre ellos encontramos los promotores de genes implicados en la biosíntesis del cuerpo basal del flagelo u otros como el gen *fliA*, que codifica un factor sigma alternativo (σ^{28}) necesario

para la activación de la síntesis de los promotores de Clase III (Ohnishi et al (1990)), donde se agrupan, entre otros, los promotores de los genes de flagelinas *fliC* y *fljB*, que conforman los dos tipos de flagelos distintos y alternativos existentes en las cepas de *S. typhimurium* (Fig. 2.4).

2.2.2.1. Estudio de la expresión de genes de los diferentes niveles del regulón flagelar

Para determinar si la disminución de la flagelina en la membrana externa de la cepa *fur* de *S. typhimurium* estaba asociada a una disminución de la expresión del gen que la codifica y si esta reducción, además, se extendía a todo el regulón flagelar, se construyeron diversas fusiones entre los promotores de genes de distintos niveles de la cascada de activación con el gen *lacZ*.

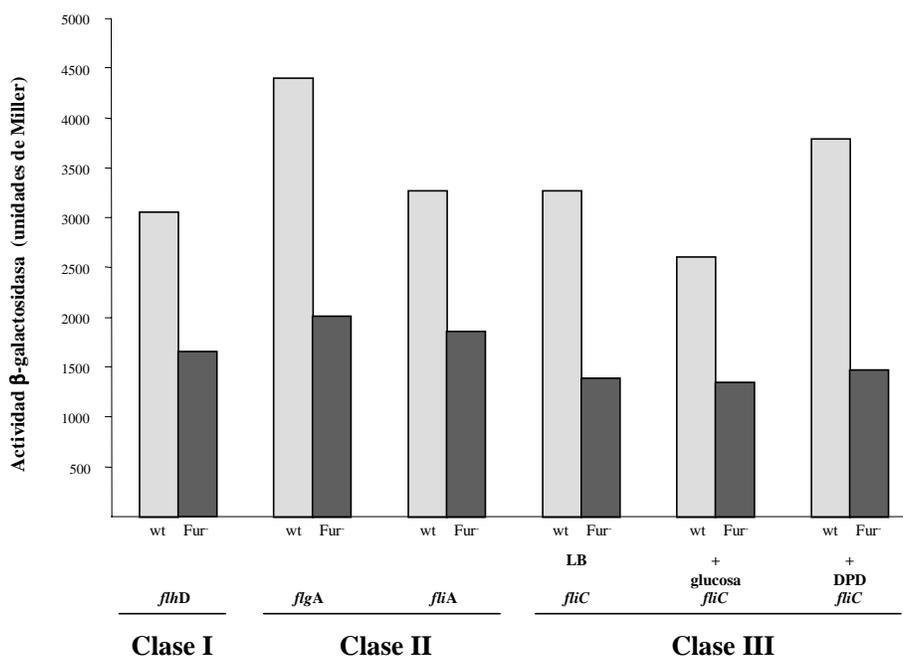


Fig. 2.5. Expresión basal de promotores pertenecientes a distintos niveles jerárquicos de la cascada del regulón flagelar. Las fusiones entre el promotor de cada uno de los genes estudiados con *lacZ* se cuantificaron mediante ensayos de β -galactosidasa en la cepa salvaje (wt) y en el Fur⁻. En el caso del estudio del promotor de *fliC* se valoraron además los niveles de expresión en presencia de DPD o de glucosa en el medio de cultivo. En todos los casos los valores representados se obtienen de como mínimo en tres experimentos independientes en los que el error máximo fue de $\pm 10\%$.

En concreto se utilizaron los promotores de *flhD* (Clase I), *flgA* y *fliA* (de Clase II) y el *fliC* (como representante de la Clase III), valorándose en cada caso el grado de expresión de estas fusiones en la cepa *Fur*⁻ en comparación con la cepa salvaje.

Como puede observarse en la Fig. 2.5, la expresión de todo el sistema flagelar se ve disminuida en un mutante *Fur*⁻. Estos datos demuestran claramente que la cascada está afectada a todos los niveles, de forma que la menor expresión del operón *flhDC* debe ser la causante del comportamiento de toda la cascada. Además, esta disminución es independiente de la presencia de Fe²⁺ en el entorno, ya que los niveles de expresión de *fliC* en la cepa salvaje en DPD son equivalentes a los obtenidos cuando ésta crece en LB. Estos resultados confirman lo observado en el patrón de proteínas de membrana externa.

2.2.3. Relación entre el gen *fur* y el AMP cíclico

Se ha demostrado que la expresión del operón *flhDC* está modulada por la presencia de AMP cíclico (cAMP) intracelular a través del complejo CRP-cAMP (Prüß et al (2001)) (Fig. 2.5).

Para determinar si la disminución de la expresión del operon *flhDC* se debía a la afectación del sistema CRP-cAMP en los mutante *fur*, se estudió la expresión de otros promotores modulados también por la concentración intracelular de cAMP, como el operón *lac* y el gen *pepE*, que codifica una α -aspartil dipeptidasa (Conlin et al (1994)). Para estudiar el comportamiento del operón *lac* en los mutantes *fur* se introdujo por conjugación el plásmido F'128, que contiene dicho operón, tanto en la cepa salvaje como en la *Fur*⁻. En el caso del estudio del gen *pepE*, se construyó una fusión entre la región promotora de dicho gen (clonada mediante oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *S. typhimurium* LT2 existente en los bancos de datos) y el gen *lacZ*. La fusión *pepE::lacZ* se clonó en el plásmido pLV106, que posteriormente se introdujo por conjugación en las cepas salvaje y deficiente en el gen *fur*.

Se valoró el grado de expresión del operón *lac* así como del promotor del gen *pepE* no solo en muestras crecidas en LB sino también en ausencia de Fe²⁺ extracelular (mediante el uso de DPD), para determinar si la concentración de dicho catión afectaba a la expresión de estos promotores. Como puede observarse en la Fig. 2.6, los promotores *lac* y *pepE*

disminuyen en el mutante *fur*. Sin embargo, la ausencia de hierro en el medio extracelular recupera los niveles de expresión de dichos genes en la cepa Fur^- , lo que relaciona inversamente la expresión de éstos, y por lo tanto el nivel de cAMP, con la cantidad de hierro existente.

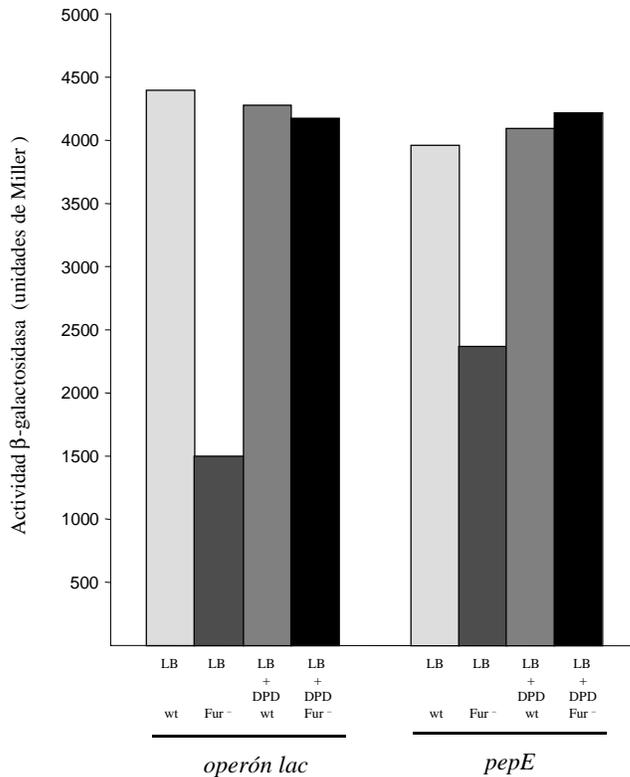


Fig. 2.6. Expresión basal del operón *lac* o del gen *pepE* en las cepas salvaje (wt) y Fur^- de *S. typhimurium* en presencia o ausencia de Fe^{2+} extracelular. En todos los casos los valores representados se obtienen de como mínimo en cuatro experimentos independientes en los que el error máximo fue de $\pm 10\%$.

2.2.3.1. Concentración de cAMP intracelular en el mutante *fur* de *S. typhimurium*

Todos los resultados expuestos hasta el momento apuntan a la existencia de una conexión entre el cAMP y la proteína Fur, o, como mínimo, una relación entre el cAMP y la cantidad de Fe^{2+} existente. Para confirmar esta asociación se determinó la concentración de cAMP en el mutante *fur* en comparación con la cepa salvaje.

En la Fig. 2.7 se puede observar que el mutante Fur^- presenta una concentración menor de cAMP intracelular independientemente de la fase de crecimiento en la que se obtenga la muestra. Por otra parte, la disminución de cAMP en la cepa mutante también es

patente en presencia de glucosa, aunque en este caso la cantidad absoluta de cAMP es menor debido a la presencia de esta fuente de carbono. Sin embargo, las concentraciones de este nucleótido en presencia de DPD son prácticamente iguales entre ambas cepas. Este hecho explicaría la recuperación de los niveles de expresión del operón *lac* o del gen *pepE* en presencia de DPD.

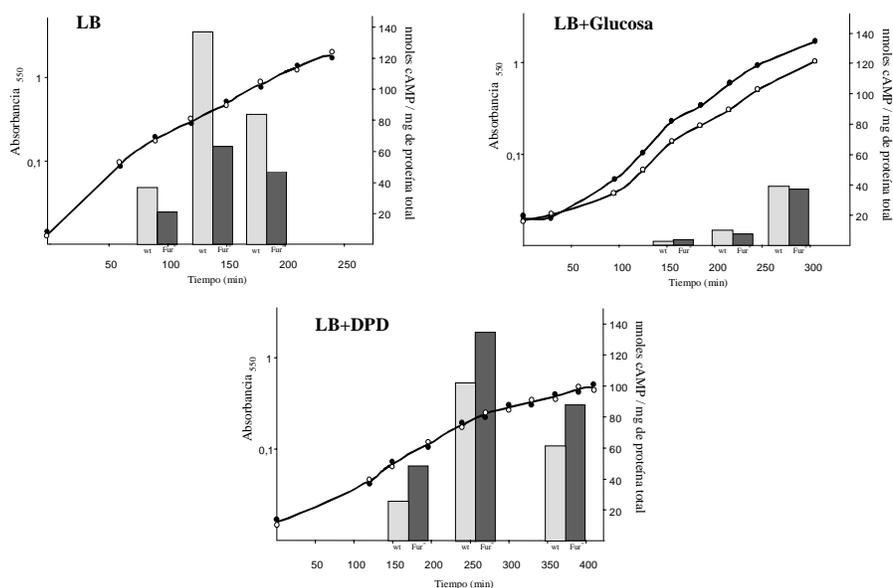


Fig. 2.7. Concentración intracelular de cAMP de las cepas de *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje (wt) y Fur⁻ crecidas en LB, en presencia de glucosa o DPD. Se muestra también la cinética de crecimiento en cada uno de estos entornos tanto de la cepa salvaje (●) como la Fur⁻ (○). Las muestras para determinar la concentración de cAMP se tomaron cuando la A₅₅₀ era de 0.1, 0.2 y 0.4 en presencia de DPD o de 0.2, 0.4 y 0.8 en los ensayos en LB o LB con glucosa.

2.2.4. Importancia de la 3',5'-cAMP fosfodiesterasa en el comportamiento del mutante *fur*

Se ha descrito que la actividad enzimática de la 3',5'-cAMP fosfodiesterasa de *E. coli*, codificada por el gen *cpdA*, se ve fuertemente estimulada por la presencia de Fe²⁺ (Imamura et al (1996), Nielsen et al (1973)). Si se asocia este dato con el hecho que se ha descrito en los mutante *fur* que la relación intracelular de Fe²⁺/Fe³⁺ es mayor que en la cepa salvaje, y que además este Fe²⁺ no se halla unido a proteínas de almacenamiento (Abdul-

Tehrani et al (1999)), se puede hipotetizar que un incremento en la actividad de este enzima podría ser el responsable de la disminución de la concentración de cAMP intracelular en el mutante *Fur⁻*. Además, y en concordancia con esta hipótesis, el crecimiento de la cepa *fur* en un medio con una concentración de hierro extremadamente baja debido a la presencia de DPD permitiría la recuperación los niveles de cAMP de dicha cepa hasta igualarlos a los de la cepa salvaje.

Por todo ello, se decidió la construcción de un mutante *cpdA* para valorar cual era realmente el papel de esta enzima y determinar, además, si los dobles mutantes *fur cpdA* recuperaban los niveles normales de cAMP.

2.2.4.1. Construcción de un mutante *cpdA*

Para la construcción del mutante *cpdA*, se utilizaron unos oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia que se obtuvo de la búsqueda por similitud con la proteína CpdA de *E. coli* (F65090) sobre el genoma de *S. typhimurium* LT2 en el Genome Sequencing Center of Washington University (<http://www.genome.wustl.edu/gsc>) y se insertó en la diana de restricción interna *HindIII* una cassette de resistencia a kanamicina (Ω Km). La construcción *cpdA::\Omega*Km se clonó posteriormente en un vector suicida, que una vez introducido por conjugación en la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 resistente a rifampicina o en la misma cepa pero con el gen *fur* interrumpido, permitió la obtención por doble intercambio de mutantes *cpdA* o dobles mutantes *cpdA fur*, respectivamente.

2.2.4.2. Concentración intracelular de cAMP en el doble mutante *fur cpdA*

Para determinar si la hipótesis planteada era correcta, se valoró la concentración intracelular de cAMP en las diversas cepas construidas.

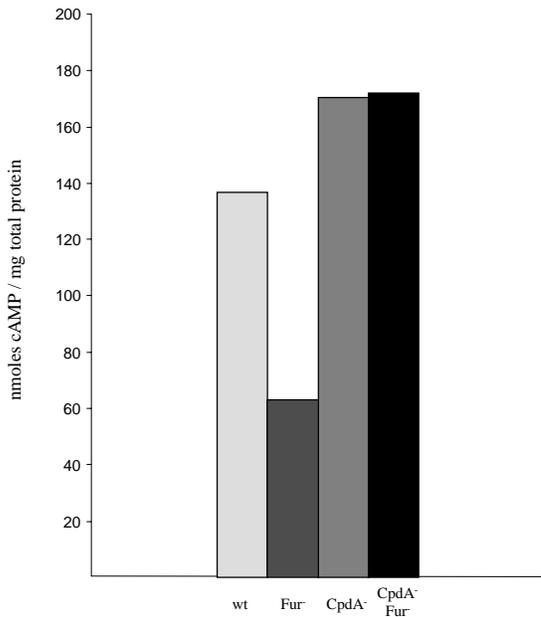


Fig. 2.8. Concentración intracelular de cAMP en las cepas CpdA⁻ y CpdA⁻Fur⁻ en comparación con los niveles de las cepas salvaje (wt) y Fur⁻. Los datos que se muestran representan un conjunto de como mínimo tres experimentos independientes con una variabilidad máxima de $\pm 10\%$

En la Fig. 2.8, se observa como la concentración intracelular de cAMP se incrementó en el doble mutante *cpdA fur* hasta restablecer los niveles normales. Estos datos confirman la hipótesis que la disminución de la concentración intracelular de cAMP en el mutante *fur* es debida al incremento de la actividad de la enzima CpdA.

2.2.5. Comportamiento de los promotores regulados por cAMP en el doble mutante *cpdA fur* de *S. typhimurium* ATCC14028

Como puede observarse en la Fig. 2.9 y en concordancia con la recuperación de los niveles de cAMP descrita para la cepa CpdA⁻ Fur⁻ (Fig. 2.8.), existe un aumento de los niveles de expresión del promotor *pepE* y del operón *lac*, que igualan el obtenido para la cepa salvaje. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los promotores implicados en la síntesis de flagelos. En estos últimos, el nivel de expresión del operón *flhDC* no se recupera, lo que comporta que el resto de los operones pertenecientes a los niveles inferiores de la cascada de activación tampoco lo hagan.

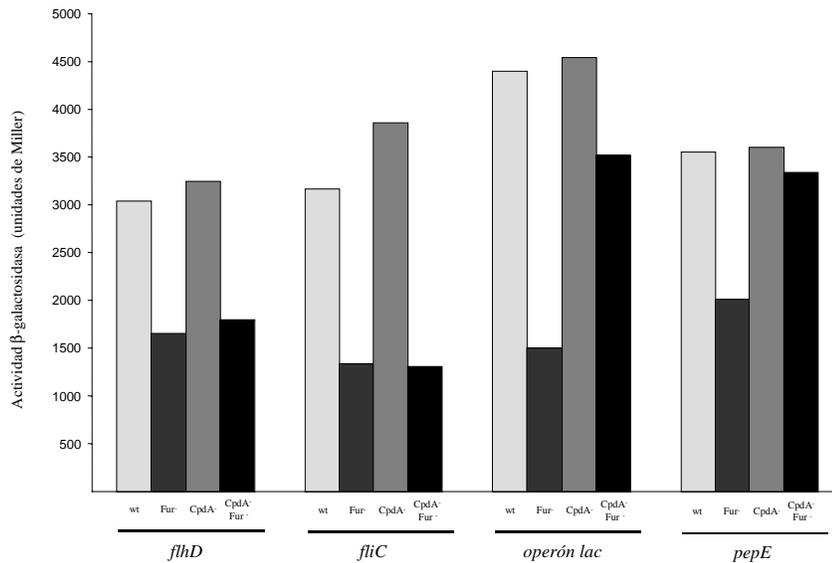


Fig. 2.9. Expresión de los genes *fliC* (Clase III), *flhD* (Clase I), *pepE* y del operón *lac* en cepas de *S. typhimurium* ATCC14028 salvajes, defectivas en el gen *fur* o *cpdA* y en dobles mutantes *cpdA fur*.

El hecho que los dobles mutantes *cpdA fur* no recuperen los niveles de expresión de los genes implicados en la síntesis flagelar de la cepa salvaje es coherente con los resultados obtenidos anteriormente, ya que, a diferencia del resto de genes modulados por la presencia de cAMP intracelular, su expresión no dependía de la concentración Fe^{2+} extracelular. De hecho, estos datos sugieren la existencia de una interacción directa entre la proteína Fur y la cascada de activación flagelar. a este respecto, los análisis de FURTA cualitativos y cuantitativos (técnica comentada en el apartado 1.1.3.1.(i) de la introducción) realizados con la cepa H1717 de *E. coli* con un vector de alto número de copias portador del promotor *flhDC* fueron claramente positivos (Fig. 2.10), demostrando la hipótesis anterior.

Sin embargo, la región promotora del gen *flhD* no parece presentar una caja Fur tradicional. Tan solo puede observarse una zona, 107 pb antes del codón de inicio de traducción, que contiene un hexámero de los tres que la conformarían. De todos modos, y como ya se ha comentado en la introducción, ésta es una característica generalizada en los

promotores controlados positivamente por Fur. De hecho, como se ha descrito anteriormente (apartado 1.1.3.1.4 de la introducción) parece que la regulación de éstos se debe un mecanismo postrascricional.

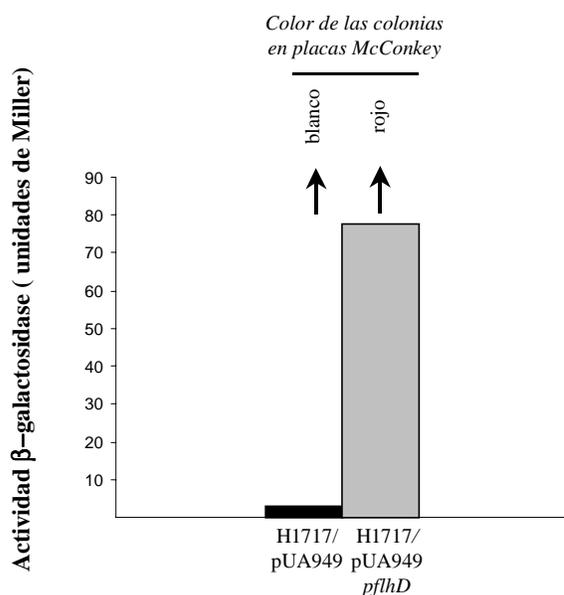


Fig. 2.10. Ensayo FURTA utilizando la cepa H1717 de *E. coli* con un derivado del plásmido pUA949 que contiene el promotor del operón *flhDC*. Como control de la expresión basal del sistema, se muestra la misma cepa con el plásmido pUA949 sin el promotor *flhDC*. Se indica también el color de las colonias en placas de McConkey, ensayo que constituye el test cualitativo.

2.2.6. Virulencia del mutante *fur*

Muchos de los datos bibliográficos que se disponían relacionados con el comportamiento de los mutantes *fur* de *S. typhimurium* se habían obtenido utilizando cepas con una mutación puntual en dicho gen (Hassett et al (1996)). Por otra parte, se ha demostrado que estas mutaciones puntuales pueden no determinar una pérdida total de las funciones de la proteína Fur (Hall et al (1996)). Por ello, nos pareció oportuno analizar con mayor profundidad el comportamiento de nuestro mutante *fur* total en lo que hace referencia a su potencial infectivo. Al igual que se había descrito previamente para otros mutantes *fur*, esta cepa presentaba una afectación importante de la virulencia cuando se inoculaba oralmente en ratones, siendo su LD₅₀ mas de 1000 veces superior a la de la cepa salvaje (Tabla 2.5). Esta atenuación de la virulencia se atribuye a la vinculación del regulador Fur con la respuesta al pH ácido (Foster et al (1994)), siendo los mutantes

afectados en esta proteína más sensibles a pH (Fig. 2.11), no superando entonces su paso por el estómago del huésped (Wilmes-Riesenberg et al (1996)).

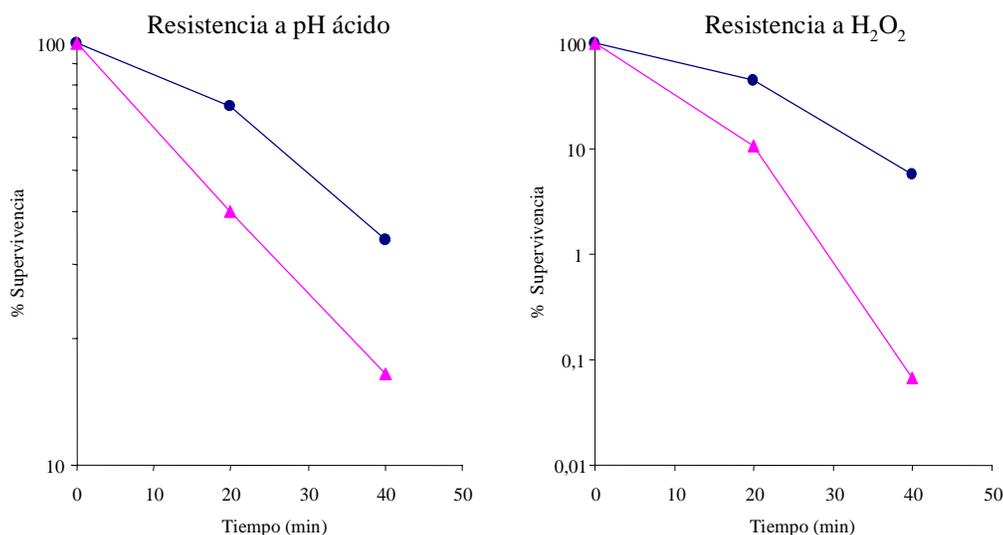


Fig. 2.11. Sensibilidad al pH ácido (pH = 3) así como al H₂O₂ (5 mM) de las cepas de *S. typhimurium* ATCC1403 salvaje (●) y *fur* (▲) en función del tiempo de exposición a estos agentes. Los resultados mostrados representan los obtenidos en 4 experimentos independientes en los que la variación máxima para cada punto no superó $\pm 10\%$.

Sin embargo, y pese a que la sensibilidad a los radicales libres de la cepa *fur* es superior a la que presenta la cepa salvaje (Fig. 2.10), no existen diferencias en la supervivencia en el interior de los macrófagos entre ambas cepas (Tabla 2.5). Por otra parte, cuando la inoculación se realiza vía intraperitoneal, la virulencia de la cepa *fur* se ve afectada en menor grado, siendo su LD₅₀ tan solo 10 veces superior a la obtenida para la cepa salvaje (Tabla 2.5). Esta disminución de la virulencia no puede atribuirse estrictamente a la disminución de la síntesis de flagelina, ya que se ha descrito que mutantes aflagelados no son menos virulentos (Lockman et al (1990), Lockman et al (1992)). En todo caso, puede ser debida a dos causas no excluyentes: Por un lado, recientemente se ha descrito que mutantes *fliZ* de *S. typhimurium* (gen de la Clase II que forma parte de la misma unidad transcripcional que *fliA*) son avirulentos (Iyoda et al

(2001)), y como se ha demostrado en los apartados anteriores, los mutantes *fur* presentan un descenso en la tasa de transcripción de toda la cascada flagelar. Por otra parte, también puede achacarse la disminución de virulencia a la menor concentración intracelular de cAMP detectada en los mutante *fur*, ya que también se ha demostrado que el proceso infectivo debido a *S. typhimurium* requiere unos niveles elevados de este nucleótido (Curtiss et al (1987)).

Tabla 2.5 Virulencia y capacidad infectiva de las cepas *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje y *fur*.

Cepa	LD ₅₀		Invasión de células epiteliales (x 10 ⁻⁴) ^a	Supervivencia en el interior de macrófagos ^b
	Oral	i.p.		
ATCC14028	5.47x10 ⁵	9	5.95±1.79	1.00±0.05
ATCC14028 Fur ⁻	>1.83x10 ⁷	115	5.04±0.44	1.09±0.42

^a Porcentaje de bacterias viables en el interior de células epiteliales pK15 (ATCC CCL-33) después de 20 min de infección.

^b Porcentaje de bacterias viables en el interior de macrófagos RAW264.7 (ATCC TIB-71) 24h después de la infección.

2.2.7. Análisis de la producción de la flagelina FljB en el mutante *fur*

S. typhimurium presenta dos tipos distintos de flagelinas, codificadas por los genes, *fliC* y *fljB*. Pese a que históricamente se ha considerado que ambos genes están incluidos en la Clase III de promotores dentro de la cascada flagelar (Chilcott et al (2000), Kutsukake et al 1990), no existe ningún trabajo en el que se haya demostrado que la regulación de estos dos genes sea la misma.

La expresión de una u otra flagelina se produce gracias a un mecanismo de conexión-desconexión del promotor que controla la síntesis de flagelina FljB y a la existencia, en la misma unidad transcripcional, de un represor específico de la síntesis de FliC (Ikeda et al (2001)), tal y como se muestra en la Fig. 2.12.

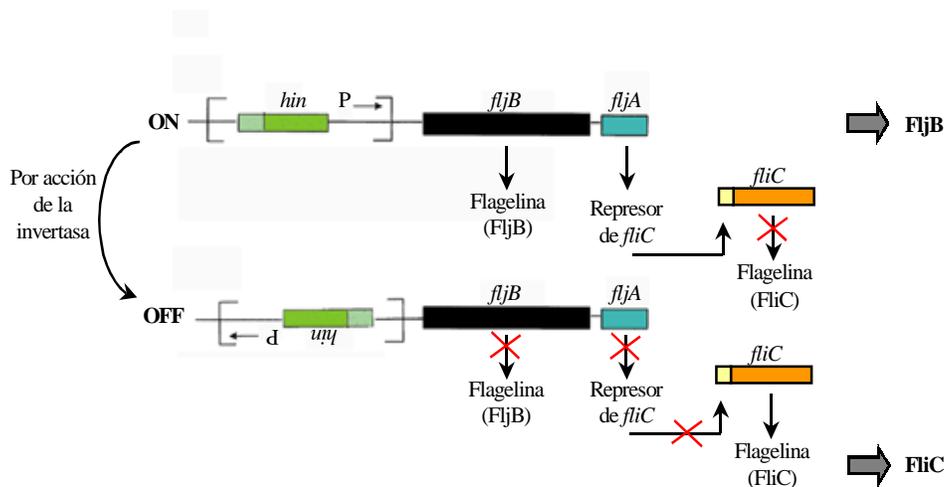


Fig. 2.12. Esquema básico del mecanismo de conexión-desconexión responsable del cambio de fase en *S. typhimurium*. La orientación del fragmento invertible (entre paréntesis en el esquema) es la que determina la existencia de un promotor activo delante de la unidad transcripcional *fljBA*, que permite cuando está correctamente orientado, la síntesis de la flagelina FljB y del represor transcripcional de *fliC*, FljA (modificado de Ikeda et al (2001)).

Por ello, y teniendo en cuenta el comportamiento de la síntesis de flagelina FliC en el mutante Fur^- , se creyó interesante estudiar cual era el grado de afectación de FljB en dicho mutante.

2.2.7.1. Estudio de las proteínas de membrana externa del mutante *fur* en función de la fase flagelar expresada

El análisis del patrón de proteínas de membrana externa no solo sirvió para confirmar fenotípicamente la cepa Fur^- obtenida, sino que permitió además observar la disminución de una banda de aproximadamente 52 kDa correspondiente a la flagelina. Sin embargo, la similitud, tanto a nivel de peso molecular como de secuencia aminoacídica, entre el producto de los dos genes que codifican las flagelinas de *S. typhimurium* (*fliC* y *fljB*), no permitió, con la secuencia del extremo N-terminal que se obtuvo, diferenciar a qué tipo correspondía la banda, para ello se tuvo que recurrir a los análisis de expresión transcripcional.

Después de determinar, mediante el uso de anticuerpos capaces de reconocer específicamente cada una de las flagelinas, que el clon a partir del que se había obtenido el

mutante *fur* expresaba de forma mayoritaria la flagelina producto del gen *fliC*, se aisló mediante el método de Gard (Ewing (1986)) un clon en el que la flagelina dominante proviniera del gen *fljB* (Fig 2.13).

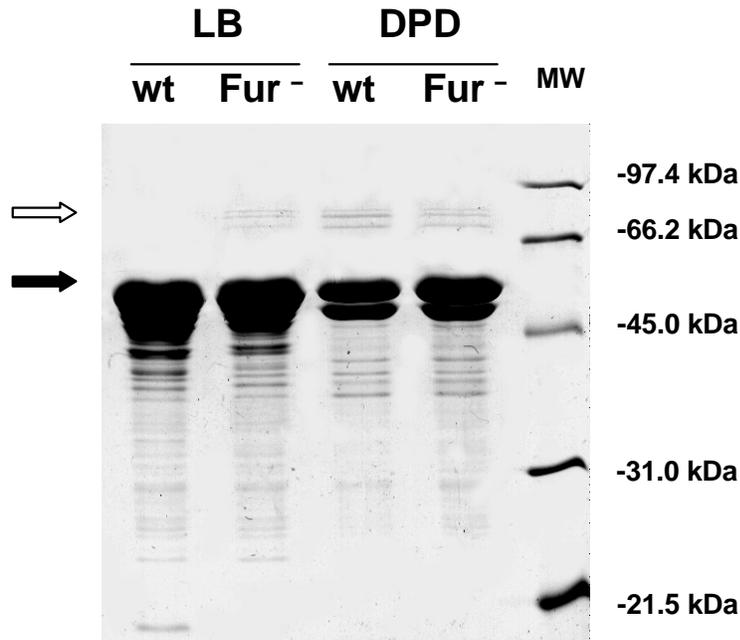


Fig. 2.13 Patrón de proteínas de membrana externa de las cepas salvaje (wt) y Fur⁻ de *S. typhimurium*, que expresan mayoritariamente la flagelina FljB, creciendo en LB o en LB+DPD. La flecha blanca señala las proteínas de alto peso molecular relacionadas con el transporte de hierro. La flecha negra indica la proteína de aproximadamente 52 kDa que corresponde a la flagelina FljB.

En el patrón de proteínas de membrana externa de esta cepa, a diferencia de lo que ocurría con la flagelina FliC, no se aprecia disminución alguna de la banda correspondiente a la flagelina FljB en el mutante *fur*.

2.2.7.2. Determinación del grado de expresión del gen *fljB* en el mutante *fur*

Para confirmar que la falta de afectación de FljB en la cepa Fur⁻ era a nivel transcripcional, se construyó una fusión de su promotor con el gen *lacZ* con el fin de estudiar la expresión mediante la producción de β -galactosidasa en distintas condiciones de cultivo.

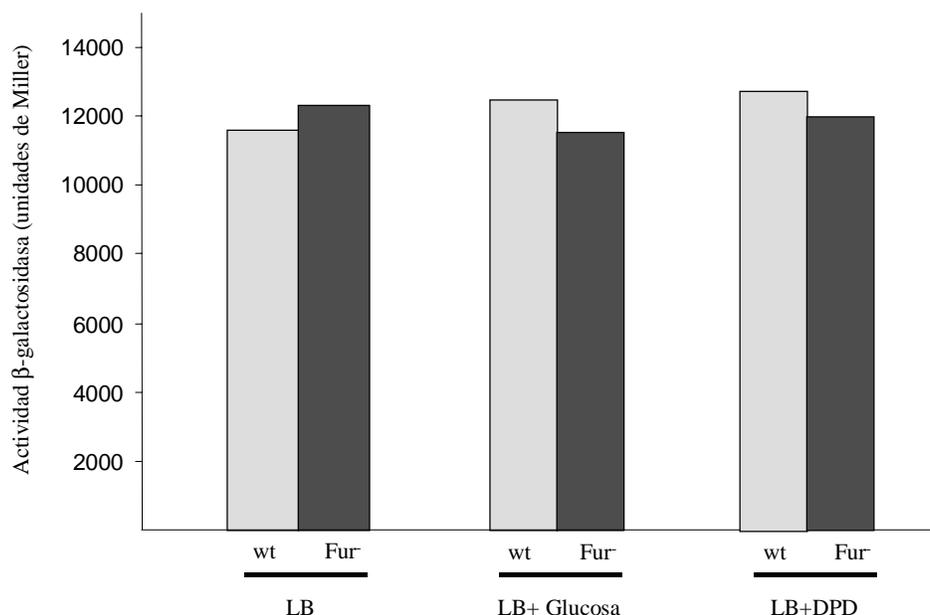


Fig. 2.14. Expresión de la fusión *fljB::lacZ* en las cepas salvaje (wt) y Fur⁻ de *S. typhimurium* ATCC14028, en LB, en presencia de glucosa o de DPD. Estos datos representan los obtenidos en como mínimo 3 experimentos en los que la variación máxima no superó $\pm 15\%$.

En todos los casos, la expresión de FljB no se ve influenciada por aquellas condiciones que sí afectan al operón *flhDC* (como la concentración de cAMP o la pérdida de la proteína Fur) y por lo tanto a toda la cascada flagelar (Fig. 2.14). En consecuencia, se puede concluir que el gen *fljB* no forma parte del regulón flagelar ni su transcripción depende de los mismos parámetros que el resto de genes implicados en éste. Estos datos son los primeros en demostrar de forma inapelable que la regulación de *fljB* es diferente a la de *fliC*.

2.3. Importancia del sistema de captación de zinc en la virulencia de *S. typhimurium* ATCC14028 (Anexo III)

El zinc es otro de los cationes divalentes importantes para el metabolismo bacteriano. La existencia de transportadores transmembrana que importan este catión al interior de la célula, al igual que la necesidad de controlar la cantidad de zinc intracelular,

lo convierten en un sistema atractivo para el estudio de su implicación en la virulencia. (Goel et al (2001), Moeck et al (2001), Bäumlner et al (1998))

Como se ha comentado en la introducción, la captación de zinc puede darse a través de sistemas de baja afinidad, como por ejemplo los dependientes de *pitA* (Beard et al (2000)), o bien mediante sistemas de alta afinidad, en los que están implicados transportadores del tipo ABC como es el caso del sistema ZnuABC (Patzner et al (1998)), y que están bajo control negativo de un regulador transcripcional dependiente de zinc, denominado Zur (Patzner et al (2000)).

Los datos acumulados hasta el momento, en relación a la implicación de estos sistemas en la virulencia de microorganismos patógenos, son escasos y a veces contradictorios, ya que en algunos casos la afectación de la capacidad infectiva es evidente (por ejemplo en los mutantes *znuA* de *H. influenzae* o *np20* de *P. aeruginosa*) (Lewis et al (1999), Wang et al (1996)), mientras que en otros, no parece tener ningún efecto (como en el caso de los mutantes *zur* de *S. aureus* (Lindsay et al (2001))). Además todos los estudios se han realizado con patógenos extracelulares, pero no existe información a cerca de la relación entre estos sistemas y la virulencia en patógenos intracelulares, que pueden hallarse en condiciones distintas a los anteriores una vez se encuentran en el interior de las células del huésped.

En este tercer apartado se presentan los resultados obtenidos al analizar la importancia de los genes *zur* y *znuABC* en la virulencia de un patógeno intracelular facultativo como es *S. typhimurium* a través de la construcción y caracterización de mutantes defectivos para dichos genes.

2.3.1. Caracterización de mutantes *zur* y *znuCB* de *S. typhimurium*

2.3.1.1. Construcción de un mutante *zur*

Para clonar el gen *zur* de *S. typhimurium* ATCC14028 se utilizaron unos oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia que se obtuvo de la búsqueda por similitud con la proteína Zur de *E. coli* (P32692) sobre el genoma de *S. typhimurium* LT2 en el Genome Sequencing Center of Washington University

donde los genes *znuCB* forman parte de la misma unidad transcripcional encontrándose, además, separados por tan solo 25 pares de bases del gen *znuA*, cuya orientación es la contraria a los anteriores (Fig. 2.16).

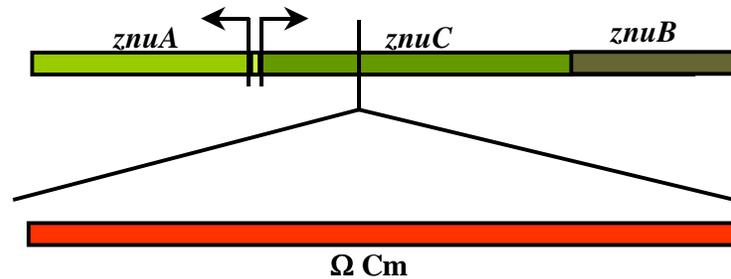
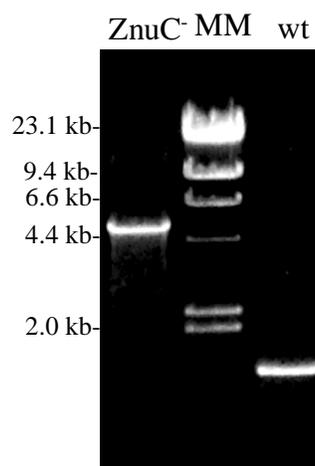


Fig. 2.16. Ordenación física de los genes *znuABC* de *S. typhimurium*. Además, se indica el punto de inserción de la cassette de resistencia a cloranfenicol (Ω Cm)

Posteriormente se insertó en la diana de restricción *StuI*, situada en la región codificante de *znuC* la cassette de resistencia a cloranfenicol (Ω Cm). Dicha construcción *znuC::* Ω Cm se insertó en el vector suicida pGP704 que permitió, después de introducirse por conjugación en la cepa resistente a rifampicina derivada de *S. typhimurium* ATCC14028, la obtención de dobles recombinantes *znuC* defectivos. Como en el caso anterior, se procedió a la introducción de la mutación de *znuC* mediante transducción con P22 en una cepa rifampicina sensible.

Fig. 2.17 PCR de comprobación de la inserción de la construcción *znuC::ΩCm* en el mutante (ZnuC) en lugar de la copia del gen salvaje (wt). MM representa el patrón de peso molecular que en este caso fue $\lambda_{HindIII}$.



2.3.2. Caracterización del mutante *zur*

2.3.2.1. Patrón de expresión de los genes *znuC* y *zur*

En la Fig. 2.18 se aprecia como la adición de un quelante, concretamente EDTA, al medio externo dispara la expresión de los genes *znuCB* hasta los mismos niveles que presenta el mutante *zur*, en el que el sistema se encuentra completamente desregulado. Debido a la inespecificidad de la mayoría quelantes, y para confirmar que el aumento de la expresión producida por el EDTA era debida a la disminución de zinc disponible en el medio, se realizó un segundo experimento en el que además de EDTA, se añadió zinc. La presencia de este metal originó un descenso en los niveles de expresión de *znuC* incluso por debajo de los que se obtienen cuando se analizan cultivos crecidos en medio sin quelante ni zinc.

Por otra parte, cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre con el gen *fur*, el gen *zur* no se autorregula en *S. typhimurium*, contrariamente a lo que sucede en otras especies bacterianas como *S. aureus* o *L. monocytogenes* (Lindsay et al (2001), Dalet et al (1999)).

2.3.2.3. Virulencia del mutante *zur*

2.3.2.3.1 Comportamiento en el interior de las células del huésped

Las pruebas realizadas con cultivos celulares de macrófagos de ratón permiten determinar que no existen diferencias en la capacidad de infección ni en la supervivencia de dichos mutantes con respecto a la cepa salvaje (Tabla 2.6).

Por otro lado, los estudios realizados con células epiteliales de cerdo, demuestran que tampoco existen diferencias con respecto a la cepa salvaje en la capacidad de atravesar las células que conforman el epitelio.

Tabla 2.6. Virulencia y capacidad infectiva de las cepas *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje y *zur* defectiva

Cepa	LD ₅₀		Invasión de células epiteliales (x 10 ⁻⁴) ^a	Supervivencia en el interior de macrófagos ^b
	Oral	i.p.		
ATCC14028	5.47x10 ⁵	9	5.95±1.79	1.00±0.05
ATCC14028 <i>Zur</i> ⁻	5.57x10 ⁵	104	6.06±1.22	1.12±0.35

^a Porcentaje de bacterias viables en el interior de células epiteliales pK15 (ATCC CCL-33) después de 20 min de infección.

^b Porcentaje de bacterias viables en el interior de macrófagos RAW264.7 (ATCC TIB-71) 24 h después de la infección.

2.3.2.3.2 Dosis letal del mutante *zur*

La LD₅₀ calculada para la cepa *Zur*⁻ tras una inoculación vía oral, fue igual a la obtenida para la cepa salvaje (Tabla 2.6).

En cambio, la inoculación intraperitoneal dio lugar a un incremento de aproximadamente 10 veces con respecto a la cepa salvaje (Tabla 2.6), teniendo un valor equiparable al obtenido para el mutante *fur*. En este último caso, la disminución de la virulencia no está relacionada con los niveles de cAMP, ya que como se ha comentado en el apartado 2.3.2.2, en los mutantes *zur* los niveles de dicho nucleótido son iguales a los de la cepa salvaje. Quizá la mayor concentración de Zn²⁺ existente en el espacio intracelular de dicho mutante pueda afectar a sistemas relacionados directa o indirectamente con la

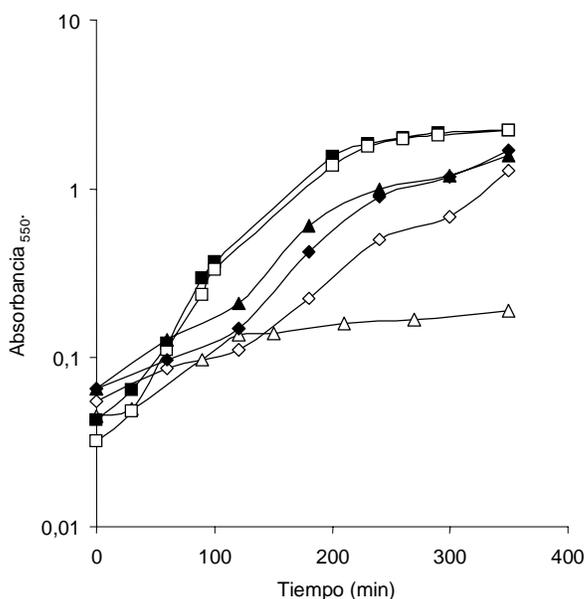
virulencia, y sea ésta la causa de la leve atenuación de la cepa Zur^- cuando se inocula intraperitonealmente.

2.3.3. Caracterización del mutante *znuC*

2.3.3.1. Estudio del crecimiento en ausencia de zinc

Para comprobar que la inserción de la cassette de resistencia a cloranfenicol en el gen *znuC* daba lugar a un mutante de los sistemas de captación de alta afinidad de Zn^{2+} , se estudió el crecimiento de dicho mutante en distintos medios de cultivo.

Fig. 2.19 Patrón de crecimiento de las cepas salvaje (■) y *znuC* (□) de *S. typhimurium* en LB, de la cepa salvaje (▲) y mutante (△) en LB+EDTA (1.5mM) o la cepa salvaje (◆) y mutante (◇) LB+EDTA + $ZnSO_4$ (1mM).



Como puede observarse claramente en la Fig. 2.19, el zinc presente en el medio LB es suficiente para permitir el crecimiento de la cepa mutante, que se comporta exactamente igual a la cepa salvaje. Por el contrario, la adición de 1.5 mM de EDTA al medio de cultivo afecta drásticamente el crecimiento del mutante *znuC* que tan solo se recupera con la adición de $ZnSO_4$ (1 mM). Como era de esperar, la introducción de un plásmido con los genes *znuCB* elimina los problemas de crecimiento de la cepa mutante.

2.3.3.2. Expresión de la unidad transcripcional *znuCB*

Otro dato que confirma la inactivación de este sistema de transporte de Zn^{2+} de alta afinidad en el mutante *znuCB* es la ligera subida que se produce en el grado de expresión de su promotor en el interior de sus células (Fig. 2.20).

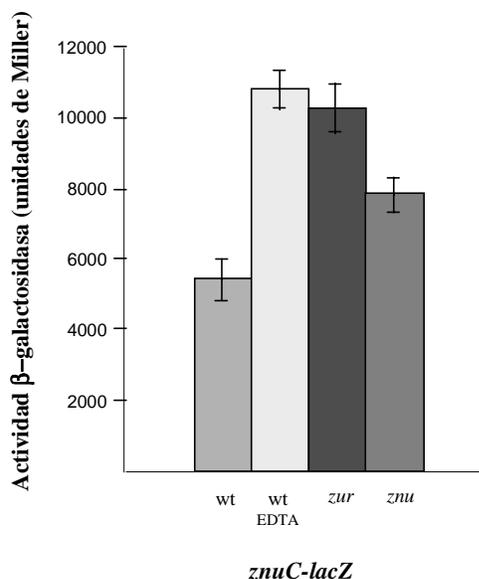


Fig. 2. 20. Expresión de la fusión *znuC::lacZ* en las cepas salvaje, *Zur* y *ZnuC* de *S. typhimurium* ATCC14028. Se muestran también los resultados obtenidos cuando se hace crecer la cepa salvaje en presencia de 1.5mM EDTA. Los datos que se muestran corresponden a los obtenidos en como mínimo tres experimentos independientes con una variación máxima entre ellos de $\pm 10\%$.

2.3.3.3. Virulencia del mutante *znuC*

2.3.3.3.1 Comportamiento en el interior de las células del huésped

Los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia en el interior de macrófagos (Tabla 2.7) así como su capacidad de penetración en las células epiteliales realizados con la cepa *ZnuC* no difieren de los obtenidos para la cepa salvaje de *S. typhimurium* ATCC14028. No observándose en el mutante ninguna deficiencia en la capacidad infectiva.

Tabla 2.7. Virulencia y capacidad infectiva de las cepas *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje y *znuC*

Cepa	LD ₅₀		Invasión de células epiteliales (x 10 ⁻⁴) ^a	Supervivencia en el interior de macrófagos ^b
	Oral	i.p.		
ATCC14028	5.47x10 ⁵	9	5.95±1.79	1.00±0.05
ATCC14028 <i>ZnuC</i> ⁻	>3.25x10 ⁷	1110	5.85±1.51	1.25±0.59

^a Porcentaje de bacterias viables en el interior de células epiteliales pK15 (ATCC CCL-33) después de 20 min de infección.

^b Porcentaje de bacterias viables en el interior de macrófagos RAW264.7 (ATCC TIB-71) 24 h después de la infección.

2.3.3.3.2 Dosis letal del mutante *znuC*

A pesar de los resultados obtenidos en los estudios de infección de cultivos celulares de macrófagos o células epiteliales, la LD₅₀ calculada para la cepa *ZnuC*⁻ es claramente superior a la de la cepa salvaje (Tabla 2.7). Esta disminución de la virulencia, atribuida a la deficiencia en la captación de zinc del mutante *znuC*, se pone más de manifiesto cuando se realiza un ensayo de competencia mediante la inoculación conjunta de éste y la cepa salvaje. Los resultados obtenidos demuestran que la recuperación de la cepa *ZnuC*⁻ al final del proceso infectivo es prácticamente nula (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Ensayo de competencia entre la cepa *S. typhimurium* ATCC14028 salvaje y el mutante *znuC*.

Composición del inóculo inicial		Porcentaje en sangre de cada cepa al final del proceso infectivo	
ATCC14028	ATCC14028 <i>ZnuC</i> ⁻	ATCC14028	ATCC14028 <i>ZnuC</i> ⁻
50%	50%	99.992%	0.008%

El hecho que los estudios con células del huésped no permitieran observar la deficiencia en la virulencia de la cepa *ZnuC*⁻ puede explicarse de dos formas. Por un lado, podría ser que los sistemas de transporte de alta afinidad fueran necesarios para la supervivencia en el medio extracelular, pero no en el interior de las células del huésped. De hecho, un comportamiento parecido se ha descrito en el caso de *Shigella dysenteriae*, para

la que la síntesis de aerobactina únicamente es fundamental en los estadios extracelulares del proceso infeccioso (Headley et al (1997)). Otra posible explicación sería que la elevada concentración de zinc existente en el medio de cultivo de las células eucariotas (factor que también se ha sugerido en los trabajos llevados a cabo con mutantes de *S. typhimurium* relacionados con el transporte de magnesio (Smith et al (1998))) permitiera que los sistemas de captación de baja afinidad fueran suficientes para soportar el crecimiento celular óptimo. En cualquier caso, en ambas situaciones no se podría observar mediante experimentos con cultivos de macrófagos, las diferencias que sí se perciben cuando se llevan a cabo inoculaciones en animal, en las que se observa claramente una afectación de su capacidad infecciosa.